



HAL
open science

Développement de capteurs électrochimiques pour le diagnostic des infections sanguines

Thibaut Babin

► **To cite this version:**

Thibaut Babin. Développement de capteurs électrochimiques pour le diagnostic des infections sanguines. Chimie organique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALI024 . tel-04137574

HAL Id: tel-04137574

<https://theses.hal.science/tel-04137574>

Submitted on 22 Jun 2023

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 : 2MGE : Matériaux, Mécanique, Génie civil, Electrochimie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Thibaut BABIN

Thèse dirigée par **Pascal MAILLEY**, Directeur de Recherche, CEA GRENOBLE
et co-encadrée par **Maxime GOUGIS**, Ingénieur Docteur, BAIO-DX
et **Pierre MARCOUX**, Ingénieur HDR, CEA GRENOBLE

préparée au sein du **Laboratoire CEA Grenoble - LETI**
dans l'**École Doctorale I-MEP2 – Ingénierie – Matériaux, Mécanique,
Environnement, Energétique, Procédés, Production**

Développement de capteurs électrochimiques pour le diagnostic des infections sanguines

Development of electrochemical sensors for bloodstream infection diagnostic

Thèse soutenue publiquement le **6 avril 2023**, devant le jury composé
de :

Madame Chantal GONDRAN

Professeur des Universités, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Présidente

Madame Sophie GRIVEAU

Professeur des Universités, CHIMIE PARISTECH PSL, Rapporteuse

Madame Brigitte LAMY

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, UNIVERSITE
CÔTE D'AZUR / IMPERIAL COLLEGE, Rapporteuse

Monsieur Pascal MAILLEY

Directeur de Recherche, CEA GRENOBLE, Directeur de thèse

Monsieur Quentin JOSSO

Ingénieur Docteur, BIOMERIEUX, Membre Invité

Monsieur Maxime GOUGIS

Ingénieur Docteur, BAIO-DX, Co-encadrant de thèse, Membre Invité

Monsieur Pierre MARCOUX

Ingénieur HDR, CEA GRENOBLE, Co-encadrant de thèse, Membre Invité



Remerciements

Après ces 3 ans formidables, c'est avec fierté et tristesse que s'achève ce doctorat. Cette expérience professionnelle et humaine n'a pas été solitaire, loin de là, et il convient donc de remercier l'ensemble des personnes ayant participé à cette aventure.

Il est impossible de retranscrire avec de simples mots le profond respect et l'estime que j'ai pour les personnes qui m'ont encadré.

En premier lieu, je souhaite donc remercier très chaleureusement **M. PASCAL MAILLEY**, directeur de cette thèse. Ses précieux et nombreux conseils, son éternel optimisme et son soutien moral indéfectible ont permis de m'améliorer en tant que chercheur mais aussi, du moins je l'espère, en tant qu'humain. Travailler à ses côtés fut un réel plaisir et une immense fierté.

Mes remerciements sincères vont ensuite à **M. PIERRE MARCOUX**, co-encadrant de cette thèse. Travailler avec une personne aussi passionnée, dans une ambiance à la fois chaleureuse et amicale, m'a donné envie de poursuivre ma carrière dans la recherche. La microbiologie m'était totalement inconnue au début de ce doctorat et c'est grâce à lui que j'ai pu comprendre et apprendre tout ce que je sais (et apprécie) dans ce domaine. Au-delà d'un mentor il est devenu un ami et j'espère pouvoir encore travailler avec lui de nombreuses années.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde gratitude à **M. MAXIME GOUGIS**, co-encadrant de cette thèse et première personne que j'ai contacté à ce sujet en avril 2019. J'aimerais donc le remercier pour sa confiance, sa détermination à débiter cette thèse malgré les quelques soucis administratifs, son écoute et ses inestimables conseils. Bien qu'en dehors du CEA pendant les 16 derniers mois de mon contrat, il a toujours été présent lorsque j'en avais besoin ce qui a été déterminant pour l'obtention de cette thèse. Les valeurs humaines et professionnelles qu'il porte m'inspirent et continueront de m'influencer tout au long de ma carrière.

Merci à **Mme. BRIGITTE LAMY** et **Mme. SOPHIE GRIVEAU** pour avoir accepté le rôle de rapporteuses de thèse. Les échanges que nous avons pu avoir ainsi que les commentaires apportés au manuscrit ont été particulièrement enrichissants.

J'aimerais ensuite remercier **Mme. CHANTAL GONDRAN** pour avoir présidée la soutenance de thèse avec pertinence et bonne humeur, menant ainsi à des discussions passionnantes.

Merci également à **M. QUENTIN JOSSO** pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Au vue du caractère applicatif de ce travail, ses remarques et questions ont été éminemment intéressantes.

Je profite également de ces quelques lignes pour remercier mon comité de suivi de thèse, **M. YVAN CASPAR** et **M. FREDERIC BARRIERE**, qui m'ont apporté soutien, encouragements et conseils, notamment concernant la rédaction du manuscrit.

Merci à **Mme. SOPHIE MORALES**, cheffe du laboratoire LSIV, et **Mme. CAROLINE PAULUS**, cheffe du laboratoire L4IV, pour leur disponibilité et pour m'avoir accueilli et intégré dans un environnement de travail serein.

J'aimerais également remercier **Mme. SEVERINE VIGNOUD** et **Mme. AMELIE REVAUX**, successivement cheffes du laboratoire L2CB, pour m'avoir « greffé » à l'équipe électrochimie bien que je sois dans un autre laboratoire. Cette navigation entre deux équipes s'est effectuée dans de très bonnes conditions, qui ont grandement participé à mon bien-être pendant ces 3 ans.

J'aimerais exprimer toute ma gratitude aux personnes ayant contribué aux résultats présentés dans ce manuscrit. Nos collaborations ont été très enrichissantes, tant sur le point de vue scientifique que sur l'aspect humain.

Merci à **TOMMY** et **PIERRE**, les experts du machine-learning, toujours disponibles pour remonter le moral dans l'open-space et sans qui l'identification bactérienne électrochimique ne serait qu'une perspective de ce travail.

Merci également à **AMELIA**, pour sa bonne humeur, les discussions de microbiologistes du futur, nos exaspérations partagées, et bien sûr pour la relecture de l'article. Sans elle, ce travail ne serait toujours pas publié et le doctorat aurait été bien triste.

Merci à **CHARLES**, pour nos débats sur l'oxyde d'iridium et sur le monde des biocapteurs, la conception de la V2 de l'aiguille instrumentée et (peut-être) la poursuite de cette thèse.

Merci à **MEHRSA**, dont le travail et l'expertise a permis d'imaginer et de créer le concept d'aiguille diagnostic, un dispositif qui pourra un jour être développé (je l'espère).

Merci à **XAVIER**, pour avoir réussi à me donner le sourire en toute circonstance et sans qui le dernier brevet n'aurait tout simplement pas vu le jour.

Merci à **STEPHAN**, pour notre procrastination organisée, mais surtout pour son idée ingénieuse de flacon à membrane qui a été déterminante dans la compréhension des résultats obtenus.

Merci à **DOMINIQUE**, pour les heures passées en salle blanche à quelques jours du rendu du manuscrit, pour obtenir les images qu'il me manquait.

Merci à l'ensemble du personnel de l'EFS et **SYLVAIN** pour m'avoir permis de travailler sur des échantillons de sang humain tout au long du doctorat.

Je souhaiterai ensuite remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire d'électrochimie: **CHARLES, FRED, GAUTHIER, ILARIA** et **SIMON**. Merci tout particulièrement à l'Electro'Cool Team et spécialement à **MELANIE** et **MICHAEL** pour leur enthousiasme et leur création artistique !

Merci également à tou·tes les autres doctorant·es que j'ai rencontré pendant ces 3 ans : **ANTOINE, AXELLE, BASTIEN, JULIETTE, KHOULOU, LENAÏC, MARIE-REINE, MATHILDE C., MATHILDE I., MAXIME, NATHALIE, PAUL...** et surtout **PRISCA** (Gisèle) pour son humour et son soutien.

Merci à l'ensemble des collègues du département et d'ailleurs : **AUDE, CAROLINE, CLAIRE, EMILIE, EMMA, GUILLAUME, HIPPOLYTE, LAURA, LAURENCE, LISELOTTE, MARIE, MURIELLE, NICOLAS, PATRICIA, SACHA, SAMIR, VERONIQUE...** mais également aux nombreux stagiaires de 3^{ème} que j'ai encadré, à mes élèves de TP de chimie de l'IUT de Grenoble et à toutes les personnes formidables que j'ai pu rencontrer lors des différentes conférences.

Je souhaiterai également remercier mes amis et camarades en dehors du laboratoire, **BORIS, AIMERIC, MAELYS, FLORENT, FLORIAN, MANON, LAETITIA, DYLAN, NICOLAS, GASPARD, CHLOÉ, NICO, JESS, TRISTAN, LOU, PIERRE, LILA, SERGE, CARO, KAREN, NADIA...** pour leur soutien, leur lutte contre mon syndrome de l'imposteur et leur patience vis-à-vis de mes « histoires de bactéries ».

Merci à ma famille et ma belle-famille pour leur soutien exemplaire du premier jour de la thèse jusqu'à la fin de la soutenance. Merci particulièrement à ma sœur, **CLAIRE-MARIE**, à ma mère, **SYLVIE**, et à mes grands-parents, **BERNARD** et **BRIGITTE**, pour leurs relectures et leur appui incroyable.

Je voudrai finalement terminer par remercier ma femme, **LÉA**, pour m'avoir soutenu, rassuré et félicité tout au long de ces 3 années. Sans elle, ce doctorat n'aurait tout simplement pas pu se terminer, ce travail a été un travail d'équipe, beaucoup plus que je ne l'imaginai il y a 3 ans.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	17
RESUME	19
ABSTRACT	21
GLOSSAIRE	23
INTRODUCTION GENERALE	27
CHAPITRE 1 ETAT DE L'ART SUR LE TEST D'HEMOCULTURE ET LE CONTEXTE DE LA THESE	31
1. LE TEST D'HEMOCULTURE	31
1.1. <i>Contexte</i>	31
1.1.1. Les bactériémies dans le monde	31
1.1.2. Prise en charge des bactériémies	33
1.2. <i>Les différentes méthodes de détection pour le test d'hémoculture</i>	35
1.2.1. Les débuts de la détection des infections sanguines.....	36
1.2.2. Les détecteurs automatisés de dioxyde de carbone	37
1.2.3. Les automates utilisant l'électrochimie.....	39
1.3. <i>L'identification bactérienne</i>	40
1.3.1. Identification après culture	40
1.3.1.1. Méthodes métaboliques.....	40
1.3.1.2. Spectrométrie de masse	42
1.3.1.3. Méthodes génomiques.....	43
1.3.1.4. Méthodes immunologiques.....	44
1.3.2. Identification pendant la culture.....	45
1.3.3. Les technologies de rupture	46
2. APPORT DE L'ELECTROCHIMIE POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION BACTERIENNE.....	50
2.1. <i>Détection de métabolites bactériens</i>	50
2.1.1. Mesure directe	50
2.1.2. Mesure indirecte	52
2.2. <i>Fixation d'un micro-organisme sur une sonde</i>	54
2.2.1. Utilisation d'un anticorps	54
2.2.2. Utilisation d'une sonde ADN/ARN.....	56
2.2.3. Utilisation de bactériophages.....	57
2.3. <i>Méthodes annexes</i>	58
2.4. <i>Conclusions sur l'intérêt de l'électrochimie en microbiologie</i>	60

3.	L'APPROCHE DE LA THESE : L'ANALYSE ELECTROCHIMIQUE SANS A <i>PRIORI</i>	61
3.1.	<i>Problématiques des hémocultures actuelles</i>	61
3.2.	<i>Le flacon instrumenté par des capteurs électrochimiques</i>	63
CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES		65
1.	RAPPELS THEORIQUES.....	65
1.1.	<i>Bactéries et métabolisme</i>	65
1.1.1.	Définitions.....	65
1.1.1.1.	Les biofilms bactériens.....	65
1.1.1.2.	Le Gram des bactéries.....	66
1.1.2.	Métabolisme bactérien.....	67
1.2.	<i>Mesure du pH</i>	68
1.2.1.	Indicateur colorimétrique.....	68
1.2.2.	Le pH-mètre.....	68
1.2.3.	Les encres conductrices.....	70
2.	CHOIX DE LA METHODE DE MESURE.....	70
2.1.	<i>Description de la potentiométrie</i>	70
2.2.	<i>Description de la spectroscopie d'impédance</i>	71
3.	FABRICATION DU BANC DE MESURE.....	73
3.1.	<i>Cahier des charges du dispositif de mesure</i>	73
3.2.	<i>Conception des électrodes</i>	75
3.2.1.	Electrode de travail.....	76
3.2.1.1.	L'encre polyaniline.....	76
3.2.1.2.	L'encre oxyde d'iridium.....	78
3.2.1.3.	Les encres carbonées sans oxyde métallique.....	80
3.2.2.	Electrode de référence.....	80
3.3.	<i>Instrumentation du flacon</i>	81
3.4.	<i>Protocole d'ensemencement et de mesure</i>	82
3.5.	<i>Utilisation de différentes matrices</i>	84
3.6.	<i>Choix des micro-organismes à étudier en priorité</i>	85
CHAPITRE 3 DETECTION ET IDENTIFICATION DES BACTERIES PENDANT LEUR CROISSANCE		87
1.	SUIVI DU PH PENDANT UNE HEMOCULTURE.....	87
1.1.	<i>Mesures électrochimiques avec la polyaniline</i>	88
1.2.	<i>Mesures électrochimiques avec l'oxyde d'iridium</i>	90
1.3.	<i>Corrélation entre pH, biomasse et potentiels</i>	92
1.3.1.	Protocole de l'expérience réalisée.....	92
1.3.2.	Résultats et discussion.....	94
1.3.2.1.	Calcul des limites de détection.....	94
1.3.2.2.	Influence du pH du milieu sur le potentiel des électrodes.....	96

1.3.3.	Conclusion	97
1.4.	<i>Utilisation de matériaux non sensibles au pH</i>	98
1.4.1.	Mesures électrochimiques avec une encre carbone	98
1.4.2.	Mesures électrochimiques d'une encre « bleu de Prusse »	100
1.5.	<i>Hypothèses de travail</i>	101
2.	SUIVI ET DETECTION D'UNE HEMOCULTURE POSITIVE	105
2.1.	<i>Evolution des potentiels en l'absence de bactérie</i>	105
2.2.	<i>Utilisation de la dérivée du potentiel</i>	107
2.3.	<i>Etude de la réponse de la polyaniline pour une croissance d'E. coli</i>	110
2.3.1.	Influence de l'inoculum	110
2.3.2.	Détection de souches différentes	113
3.	BASE DE DONNEES SUR PLUSIEURS ESPECES BACTERIENNES	115
3.1.	<i>Les bactéries à Gram négatif</i>	115
3.1.1.	Les entérobactéries	115
3.1.2.	Les autres bactéries à Gram négatif	116
3.2.	<i>Les bactéries à Gram positif</i>	117
3.2.1.	Les staphylocoques	118
3.2.2.	Les autres coques à Gram positif	119
3.3.	<i>Détection de fongémies</i>	120
4.	LE CALCUL DU TEMPS DE DETECTION	121
5.	IDENTIFICATION PAR APPRENTISSAGE MACHINE	126
5.1.	<i>Traitement des données</i>	126
5.1.1.	Choix d'un descripteur adapté	126
5.1.2.	Choix d'un classifieur adapté	129
5.2.	<i>Performances d'identification</i>	131
5.2.1.	Identifier le Gram d'une bactérie	131
5.2.2.	Identifier le genre d'une bactérie	132
5.2.3.	Algorithmes « croisés »	136
5.3.	<i>Contribution des différents matériaux d'électrodes pour l'identification</i>	138
6.	CONCLUSION	139
CHAPITRE 4 ETUDE DU PHENOMENE OBSERVE PAR POTENTIOMETRIE		141
1.	INFLUENCE DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX SUR LE SIGNAL MESURE	141
1.1.	<i>Influence du milieu de culture</i>	141
1.2.	<i>Influence de l'agitation et de la température</i>	145
1.2.1.	Abaissement de la température de culture	146
1.2.2.	Suppression de l'agitation	146
1.2.3.	Mesure dans le surnageant	147
1.3.	<i>Influence de la surface d'électrode</i>	148
2.	HYPOTHESE DE LA DETECTION D'UN BIOFILM BACTERIEN	149

2.1.	<i>Mesures potentiométriques avec filtration par diffusion</i>	150
2.1.1.	Objectifs de l'expérience.....	150
2.1.2.	Résultats.....	151
2.1.3.	Hypothèse concernant le fonctionnement de notre détection.....	155
2.2.	<i>Etude par spectroscopie d'impédance</i>	155
2.2.1.	Objectifs de l'expérience.....	155
2.2.2.	Résultats et discussion.....	157
2.2.2.1.	Impact de la mesure EIS sur la détection.....	157
2.2.2.2.	Evolution de l'impédance pendant la croissance : le cas de la polyaniline.....	159
2.2.2.3.	Etude de l'impédance à 0,1 Hz.....	162
2.3.	<i>Observations par microscopie numérique</i>	165
3.	CONCLUSION.....	166
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		169
LA DETECTION ELECTROCHIMIQUE DES INFECTIONS SANGUINES.....		169
PERSPECTIVES.....		172
<i>Projet de recherche</i>		172
<i>Développement du procédé de mesure potentiométrique</i>		175
<i>Applications industrielles envisagées</i>		176
Comment instrumenter des flacons ?.....		176
Domaines d'applications de la détection électrochimique.....		178
ANNEXES.....		179
I.	HEMOCULTURE NEGATIVE PENDANT 3 SEMAINES.....	179
II.	ENSEMBLE DES SIGNATURES ELECTROCHIMIQUES DE LA POLYANILINE POUR <i>E. COLI</i>	181
III.	BASE DE DONNEES UTILISEES POUR L'IDENTIFICATION PAR APPRENTISSAGE MACHINE.....	183
IV.	IMPACT ENVIRONNEMENTAL ET CONCEPTION DURABLE.....	185
V.	SIGNATURES POTENTIOMETRIQUES DE QUELQUES AUTRES MATERIAUX D'ELECTRODES.....	187
VI.	INSTRUMENTATION DES FLACONS D'HEMOCULTURE.....	189
VII.	DETECTION D'UNE CROISSANCE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PAR POTENTIOMETRIE.....	193
VIII.	PRODUCTION SCIENTIFIQUE REALISEE PENDANT CE DOCTORAT.....	195
BIBLIOGRAPHIE.....		197
BIBLIOGRAPHIE DE L'INTRODUCTION.....		197
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 1.....		197
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 2.....		212
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 3.....		214
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 4.....		217
BIBLIOGRAPHIE DE LA CONCLUSION.....		218

Liste des figures

FIGURE I-1 : TAUX DE SURVIE DES PATIENTS SOUFFRANT D'UNE INFECTION SANGUINE ET POURCENTAGE DES PATIENTS TRAITES AVEC UNE ANTI-BIOTHERAPIE ADAPTEE EN FONCTION DU TEMPS DE PRISE EN CHARGE (ADAPTE DE LA BROCHURE DE BIOMERIEUX « BLOOD CULTURE : A KEY INVESTIGATION FOR DIAGNOSIS OF BLOODSTREAM INFECTIONS » ³).....	27
FIGURE 1-1 : CARTE DU MONDE AVEC POURCENTAGE D'ISOLATS DE MRSA (<i>METICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>) PAR PAYS EN 2019 ⁹	32
FIGURE 1-2 : SCHEMA CHRONOLOGIQUE SIMPLIFIE DU DIAGNOSTIC D'UNE BACTERIEMIE A L'HOPITAL. LE TEMPS DE TRANSPORT DEPEND DE L'HEURE ET DU LIEU DE PRELEVEMENT TANDIS QUE LE TEMPS D'INCUBATION DEPEND DE L'ESPECE BACTERIENNE (OU FONGIQUE) PRESENTE DANS LE SANG DU PATIENT. L'IDENTIFICATION PEUT SE FAIRE AU MIEUX EN 1 H PAR MALDI-TOF DIRECTEMENT SUR CULOT D'HEMOCULTURE MAIS NECESSITE HABITUELLEMENT UNE SOUS-CULTURE SUR BOITE DE PETRI POUR ISOLER LE MICRO-ORGANISME. L'ANTIBIOGRAMME, OU AST (POUR <i>ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING</i>), PEUT SE FAIRE EN QUELQUES HEURES EN PHASE LIQUIDE OU EN 24 H SUR GELOSE, SUIVANT L'AUTOMATE UTILISE.	33
FIGURE 1-3 : SCHEMAS CHRONOLOGIQUES SIMPLIFIES DU DIAGNOSTIC D'UNE BACTERIEMIE POUR UN PATIENT PRELEVE LE MATIN EN SEMAINE ET POUR UN PATIENT PRELEVE LE SOIR EN SEMAINE. CES DEUX CAS SONT SUPPOSES AVEC UNE IDENTIFICATION RAPIDE (EN 1 H, SUR CULOT D'HEMOCULTURE).....	35
FIGURE 1-4 : (GAUCHE) FLACON BIPHASIQUE HEMOLINE™ (BIOMERIEUX) (DROITE) FLACONS POSITIF ET NEGATIF SIGNAL™ (OXOID LTD).	36
FIGURE 1-5 : (GAUCHE) GAMME DES FLACONS BACT/ALERT® (DROITE) VARIATION DE COULEUR ENTRE DES FLACONS BACT/ALERT® POSITIFS ET NEGATIFS ⁴²	38
FIGURE 1-6 : MESURE INDIRECTE DE LA CONDUCTIVITE PENDANT LA CULTURE ⁵¹ . (GAUCHE) SYSTEME MALTHUS (DROITE) SYSTEME RABIT.	40
FIGURE 1-7 : (GAUCHE) EXEMPLE DE GALERIE API (HTTPS://FR.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/GALERIE_API) (DROITE) BOITE CHROMID® PERMETTANT DE DETECTER LES BACTERIES A GRAM NEGATIF RESISTANTES A LA COLISTINE (HTTP://WWW.BIOMERIEUX-CULTUREMEDIA.COM/PRODUCT/119-CHROMID-COLISTIN-R)	41
FIGURE 1-8 : PRINCIPE DE LA SPECTROMETRIE MALDI-TOF PAR CROXATTO <i>ET AL.</i> ⁵⁹	42
FIGURE 1-9 : DEUX TYPES DE TESTS IMMUNOLOGIQUES ⁶¹ . (GAUCHE) TEST PAR AGGLUTINATION. LE MEME NOMBRE D'ANTIGENES EST AJOUTE A CHAQUE TUBE, ET LE SERUM DU PATIENT EST DILUE EN SERIE. LE TITRE DANS CE CAS CORRESPOND A LA DERNIERE DILUTION PERMETTANT UNE AGGLUTINATION (ICI 1/160). (DROITE) TEST WESTERN BLOT DE <i>TRICHINELLA</i> (PARASITE). LA LIAISON DE L'ANTICORPS SECONDAIRE AVEC L'ANTICORPS PRIMAIRE EST DETECTEE PAR COLORIMETRIE.....	44
FIGURE 1-10 : (GAUCHE) MATRICE DU <i>COLORIMETRIC SENSOR ARRAY</i> (CENTRE) INSTRUMENTATION D'UN BOUCHON DE FLACON D'HEMOCULTURE (DROITE) PROTOTYPE D'AUTOMATE UTILISANT LE SYSTEME DU CSA ⁷⁰	45
FIGURE 1-11 : PRINCIPE DE L'UTILISATION DE LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR) POUR LA DETECTION DE BACTERIES. UN RESEAU D'ANTICORPS EST IMMOBILISE SUR UN PRISME SPR, MIS EN CONTACT AVEC UNE HEMOCULTURE POSITIVE. LA LUMIERE INCIDENTE ILLUMINE LE PRISME ET LA LUMIERE REFLECHIE EST ENREGISTREE. LE COUPLAGE ANTICORPS-BACTERIES	

ENGENDRERA UN SIGNAL SPECIFIQUE DETECTABLE. LE CHOIX D'UNE MATRICE D'ANTICORPS ADAPTEE PERMETTRA UNE DETECTION MULTIPARAMETRIQUE ET DONC UNE IDENTIFICATION ⁷¹ .	46
FIGURE 1-12 : PRINCIPE DE DETECTION PAR RESONNANCE MAGNETIQUE PROPOSEE PAR LE SYSTEME T2MR ^{®73} .	47
FIGURE 1-13 : FORMULE DEVELOPEE DE LA PYOCYANINE, DU 2-HEPTYL-4(1H)-QUINOLONE (HHQ) ET DE LA PSEUDOMONAS QUINOLONE SIGNAL (PQS).	51
FIGURE 1-14 : EVOLUTION TEMPORELLE DES SWV SUR UNE ELECTRODE DE CARBONE VITREUX DANS LE SURNAGEANT D'UNE CULTURE DE <i>P. AERUGINOSA</i> ⁹⁹ . ON OBSERVE LE PIC CARACTERISTIQUE DE LA PYOCYANINE (PYO) ET D'AUTRES PICS CORRESPONDANT A D'AUTRES MOLECULES DU <i>QUORUM SENSING</i> .	52
FIGURE 1-15 : SCHEMA REPRESENTANT LA METHODE UTILISEE PAR SUN <i>ET AL.</i> ¹⁰⁸ AFIN DE DETECTER <i>E. COLI</i> . EN PRESENCE DE LA BACTERIE, LA P-BENZOQUINONE SE REDUIT EN HYDROQUINONE, QUI REAGIT AVEC LA P-BENZOQUINONE RESTANTE POUR FORMER UN COMPLEXE ROUGE (QUINHYDRONE).	53
FIGURE 1-16 : ILLUSTRATION DU PROCEDE DE PANHWAR <i>ET AL.</i> ¹¹⁶ POUR LA CAPTURE DE <i>E. COLI</i> VIA DES NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISEES AVEC DES ANTICORPS (<i>SCPE : SCREEN PRINTED CARBON ELECTRODE</i>).	55
FIGURE 1-17 : SCHEMA DE LA METHODE DE SHABANI <i>ET AL.</i> ¹³⁷ . DES PHAGES T4 (SPECIFIQUES A <i>E. COLI</i>) SONT IMMOBILISES SUR DES ELECTRODES EN CARBONE SERIGRAPHIE (<i>SPE : SCREEN PRINTED CARBON ELECTRODE</i>). LA DETECTION SE FAIT PAR MESURE D'IMPEDANCE.	57
FIGURE 1-18 : UTILISATION D'UN POLYMERE A IMPREGNATION MOLECULAIRE ELABORE PAR DES BACTERIES, DEVELOPPE PAR WANG <i>ET AL.</i> ¹⁴⁴ . LA CAPTURE DE <i>S. AUREUS</i> BLOQUE UNE REACTION ICI AVEC $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, DETECTABLE ELECTROCHIMIQUEMENT PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE.	58
FIGURE 1-19 : SCHEMA REPRESENTANT LA METHODE UTILISEE PAR CHEN <i>ET AL.</i> ¹⁴⁵ AFIN DE DETECTER <i>E. COLI</i> . EN PRESENCE DE BACTERIES, LES NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISEES « LIBERENT » LE SITE ACTIF DE L'ENZYME POUR SE LIER PREFERENTIELLEMENT AU MICRO-ORGANISME. LA REACTION ENZYMATIQUE EST DETECTEE PAR ELECTROCHIMIE.	59
FIGURE 1-20 : DIAGRAMME D'UTILISATION DU PODLER [®] PERMETTANT L'UTILISATION DU TEMPS DE TRANSPORT POUR DEBUTER LA DETECTION. (<i>SOURCE : BROCHURE PODLER 2022 - HTTPS://WWW.QLINEA.COM/</i>).	62
FIGURE 2-1 : PROCESSUS DE FORMATION D'UN BIOFILM PAR GUPTA <i>ET AL.</i> ⁴ . LES CELLULES PLANCTONIQUES S'ATTACHENT DE MANIERE REVERSIBLE A UNE SURFACE PUIS CETTE LIAISON DEVIENT IRREVERSIBLE. UNE COLONIE SE FORME ALORS SUR LA SURFACE, EN BIOFILM, PUIS SE STABILISE. LA COLONISATION D'UNE NOUVELLE SURFACE EST PERMISE PAR LA DISPERSION DES BACTERIES SITUEES SUR LES COUCHES EXTERIEURES DU BIOFILM.	66
FIGURE 2-2 : REPRESENTATION DES MEMBRANES CELLULAIRES DES BACTERIES A GRAM POSITIF ET A GRAM NEGATIF. ⁵ (CAP = PROTEINE LIEE PAR LIAISON COVALENTE; IMP = PROTEINE DE MEMBRANE INTEGRALE; LP = LIPOPROTEINE; LPS = LIPOPOLYSACCHARIDE; LTA = ACIDE LIPOTEICHOÏQUE; OMP = PROTEINE MEMBRANAIRE EXTERNE; WTA = ACIDE TEICHOÏQUE MURAL).	67
FIGURE 2-3 : ELECTRODE COMBINEE D'UN PH-METRE ⁹ CLASSIQUEMENT UTILISE EN LABORATOIRE.	69
FIGURE 2-4 : MESURE POTENTIOMETRIQUE ENTRE UNE ELECTRODE DE TRAVAIL METALLIQUE ET UNE ELECTRODE DE REFERENCE, PAR UN VOLTMETRE A HAUTE IMPEDANCE.	71
FIGURE 2-5 : REPRESENTATION DE LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ¹¹ . (A) SIGNAUX D'ENTREE ET DE SORTIE LORS D'UNE MESURE D'IMPEDANCE. (B) SCHEMA EQUIVALENT ET DIAGRAMMES DU MODELE DE RANDLES. (C) SCHEMA EQUIVALENT ET DIAGRAMMES POUR UN SYSTEME OU LA DIFFUSION N'INTERVIENT PAS.	73

FIGURE 2-6 : (A.) SCHEMA DE LA DISPOSITION DES DIFFERENTS MATERIAUX D'ELECTRODES SUR UNE PLATEFORME GENERIQUE. (B.) EMPILEMENTS DES MATERIAUX SUR UNE ELECTRODE DE TRAVAIL ET UNE ELECTRODE DE REFERENCE. UNE SOUS-COUCHE D'ENCRE CARBONE EST PRESENTE SUR TOUTES LES ELECTRODES. (C.) PHOTO D'UNE PLATEFORME GENERIQUE RECOUVERTE D'ENCRES CONDUCTRICES.	75
FIGURE 2-7 : SCHEMA DES EQUILIBRES DE LA PANI MONTRANT LA REPOSE AUX CHANGEMENTS DE PH OU DE POTENTIEL ²¹	76
FIGURE 2-8 : MESURES ELECTROCHIMIQUES DU POTENTIEL DE DIFFERENTES DILUTIONS D'UNE ENCRE DE POLYANILINE COMMERCIALE, DANS DES SOLUTIONS A DIFFERENTS PH. LES DILUTIONS SONT EFFECTUEES DANS DE L'EAU DISTILLEE. LES DIFFERENTS PH (VALEURS NOTEES SUR LA COURBE) SONT OBTENUS DANS DES SOLUTIONS DE PBS 1X PAR AJOUT D'ACIDE SULFURIQUE 99 %. LE POTENTIEL A ETE NORMALISE POUR DEBUTER A 0 mV VS Ag/AgCl POUR CHAQUE ELECTRODE.	77
FIGURE 2-9 : CALCUL DE LA MODIFICATION DE LA SENSIBILITE PH DE LA POLYANILINE APRES STERILISATION PAR AUTOCLAVE. LE PROCESSUS DE STERILISATION OCCASIONNE ICI UNE PERTE DE SENSIBILITE DE 20 mV/UNITE PH.	78
FIGURE 2-10 : MESURES ELECTROCHIMIQUES DU POTENTIEL DE DEUX ELECTRODES COMPOSEES D'UNE ENCRE OXYDE D'IRIDIUM, DANS DES SOLUTIONS A DIFFERENTS PH. LES DIFFERENTS PH (VALEURS NOTEES SUR LA COURBE) SONT OBTENUS DANS DES SOLUTIONS DE PBS 1X PAR AJOUT D'ACIDE SULFURIQUE 99 %.	79
FIGURE 2-11 : PHOTO D'UN FLACON DE MESURE SANS SCOTCH KAPTON®	81
FIGURE 2-12 : SCHEMA EXPLICATIF DE LA DILUTION EN CASCADE (INSPIRE DU LIVRE « BIOLOGIE-DES-MICRO-ORGANISMES » ⁶)	83
FIGURE 3-1 : EVOLUTION DU POTENTIEL DE DEUX ELECTRODES DE POLYANILINE (WE = WORKING ELECTRODE), PENDANT UNE CROISSANCE BACTERIENNE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> (40 CFU A T=0) ET POUR UN FLACON STERILE (NEGATIF). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	88
FIGURE 3-2 : EVOLUTION DU POTENTIEL DE DEUX ELECTRODES D'OXYDE D'IRIDIUM, PENDANT UNE CROISSANCE BACTERIENNE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> (40 CFU A T=0) ET POUR UN FLACON STERILE (NEGATIF). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	90
FIGURE 3-3 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'EXPERIENCE. DEUX FLACONS TEMOINS, INOCULES AVEC LA MEME BIOMASSE, PERMETTENT LE SUIVI DE LA DENSITE OPTIQUE EN FONCTION DU TEMPS, QUI DONNE UNE CONCENTRATION BACTERIENNE APPROXIMATIVE (EN CFU/ML). UN PRELEVEMENT DE 2 ML DE L'HEMOCULTURE EST EFFECTUE REGULIEREMENT TOUTES LES 30 MINUTES ENVIRON : 1 ML POUR LA MESURE DE PH, 1 ML POUR LE COMPTAGE DE LA BIOMASSE. EN PARALLELE, LES EVOLUTIONS DE POTENTIEL SONT ENREGISTREES PENDANT TOUTE LA PERIODE DE CROISSANCE BACTERIENNE.	93
FIGURE 3-4 : CORRESPONDANCE POTENTIEL-BIOMASSE PENDANT LA CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> (ATCC 8739) DANS UN MELANGE BACT/ALERT® FA PLUS + SANG DE CHEVAL DEFIBRINE.	95
FIGURE 3-5 : CORRESPONDANCE POTENTIEL-PH PENDANT LA CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> (ATCC 8739) DANS UN MELANGE BACT/ALERT® FA PLUS + SANG DE CHEVAL DEFIBRINE.	96
FIGURE 3-6 : EVOLUTION DU POTENTIEL DE DEUX ELECTRODES DE CARBONE, PENDANT UNE CROISSANCE BACTERIENNE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> (40 CFU A T=0) ET POUR UN FLACON STERILE (NEGATIF). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	99
FIGURE 3-7 : EVOLUTION DU POTENTIEL DE DEUX ELECTRODES EN ENCRE CARBONE + BLEU DE PRUSSE, PENDANT UNE CROISSANCE BACTERIENNE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> (40 CFU A T=0) ET POUR UN FLACON STERILE (NEGATIF). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	100

FIGURE 3-8 : SUIVI POTENTIOMETRIQUE D'UNE CROISSANCE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> A PARTIR D'UN INOCULUM DE 40 CFU A T=0 AVEC 4 MATERIAUX D'ELECTRODES DIFFERENTS (POLYANILINE, OXYDE D'IRIDIUM, ENCRE « BLEU DE PRUSSE », ENCRE CARBONE). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	102
FIGURE 3-9 : EXPERIENCE DE WILKINS ET STONER ⁸ , ENREGISTREMENT DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL ENTRE UNE ELECTRODE DE MESURE EN PLATINE ET UNE ELECTRODE AU CALOMEL STANDARD (SCE-BECKMAN INSTRUMENTS INC.) PENDANT LA CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> (1,9 CFU/ML A T ₀), DANS 40 ML DE BOUILLON DE CULTURE A 35°C.	103
FIGURE 3-10 : DIFFERENCES <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i> DANS L'INJECTION DE CHARGE ET LES PROPRIETES ELECTROCHIMIQUES DES ELECTRODES D'OXYDE D'IRIDIUM D'APRES UNE ETUDE DE STUART COGAN ⁹ . LES PICS DE REDUCTION SE SITUENT ENTRE +70 mV ET -250 mV VS Ag/AgCl.	104
FIGURE 3-11 : COURBES POTENTIOMETRIQUES OBTENUES POUR UNE EXPERIENCE DITE NEGATIVE, PENDANT 5 JOURS. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	106
FIGURE 3-12 : COURBES POTENTIOMETRIQUES DES ELECTRODES DE POLYANILINE, OBTENUES POUR DEUX EXPERIENCES NEGATIVES DANS DEUX MILIEUX DIFFERENTS, PENDANT 5 JOURS. MILIEU 1 = BACT/ALERT® FA PLUS. MILIEU 2 = HEMOCULTURE DE SANG HUMAIN DANS DU BACT/ALERT® FA PLUS. INCUBATION A 37°C, 90 RPM.	107
FIGURE 3-13 : COURBES POTENTIOMETRIQUES DES ELECTRODES EN POLYANILINE POUR DEUX DETECTIONS D' <i>E. COLI</i> ET UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	108
FIGURE 3-14 : DERIVEE LISSEE DU POTENTIEL DES ELECTRODES EN POLYANILINE POUR DEUX DETECTIONS D' <i>E. COLI</i> ET UN NEGATIF. LES IMPORTANTES DIFFERENCES DE PENTES PERMETTENT UNE DETECTION RAPIDE ET VISUELLE. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	109
FIGURE 3-15 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR TROIS INOCULUMS DIFFERENTS D' <i>E. COLI</i> (ATCC 25922) ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	111
FIGURE 3-16 : TEMPS DE DETECTION (PAR ELECTRODE ET EN MOYENNE) CALCULES AVEC LA DERIVEE LISSEE DU POTENTIEL DE LA POLYANILINE, POUR DEUX SOUCHES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> ET PLUSIEURS INOCULUMS. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	112
FIGURE 3-17 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR TROIS SOUCHES DE REFERENCE D' <i>E. COLI</i> (ATCC 25922) ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	114
FIGURE 3-18 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR CINQ ESPECES D' <i>ENTEROBACTERALES</i> ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM. L'ESPECE <i>E. COLI</i> A ETE TESTEE 12 FOIS, L'ESPECE <i>K. AEROGENES</i> A ETE TESTEE 5 FOIS, L'ESPECE <i>K. PNEUMONIAE</i> A ETE TESTEE 2 FOIS, L'ESPECE <i>E. CLOACAE</i> A ETE TESTEE 4 FOIS, L'ESPECE <i>C. FREUNDII</i> A ETE TESTEE 3 FOIS.	116
FIGURE 3-19 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR 7 ESPECES DE BACILLES A GRAM NEGATIF ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM. L'ESPECE <i>P. AERUGINOSA</i> A ETE TESTEE 3 FOIS, L'ESPECE <i>A. BAUMANNII</i> A ETE TESTEE 3 FOIS.	117
FIGURE 3-20 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR 5 SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	

L'ESPECE <i>S. AUREUS</i> A ETE TESTEE 7 FOIS , L'ESPECE <i>S. EPIDERMIDIS</i> A ETE TESTEE 12 FOIS, L'ESPECE <i>S. SAPROPHYTICUS</i> A ETE TESTEE 1 FOIS, L'ESPECE <i>S. CAPITIS</i> A ETE TESTEE 1 FOIS.....	118
FIGURE 3-21 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR 3 SOUCHES DE COCCI A GRAM POSITIF ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM. L'ESPECE <i>E. FAECIUM</i> A ETE TESTEE 1 FOIS, L'ESPECE <i>E. FAECALIS</i> A ETE TESTEE 3 FOIS, L'ESPECE <i>S. PYOGENES</i> A ETE TESTEE 3 FOIS.	119
FIGURE 3-22 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR 3 SOUCHES DE LEVURES DU GENRE <i>CANDIDA</i> ET COMPARAISON AVEC UN NEGATIF. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM. L'ESPECE <i>C. ALBICANS</i> A ETE TESTEE 2 FOIS, L'ESPECE <i>C. TROPICALIS</i> A ETE TESTEE 1 FOIS.	120
FIGURE 3-23 : COURBES POTENTIOMETRIQUES ET DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL ASSOCIEES DE 4 MATERIAUX D'ELECTRODES DIFFERENTS POUR UNE MEME CULTURE D'UNE SOUCHE D' <i>E. COLI</i> . HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	122
FIGURE 3-24 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DE L'ENCRE CARBONE POUR UNE CROISSANCE DE <i>CITROBACTER FREUNDII</i> . HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM. LA DETECTION DE LA CROISSANCE SE FAIT AUTOUR DES 13 H D'INCUBATION MAIS LA DERIVEE LISSEE DU POTENTIEL DE L'ELECTRODE 8 EST SUPERIEURE A +4,7 mV/H DES 4 H D'INCUBATION. LA VALEUR SEUIL PERMETTANT DE CALCULER LE TEMPS DE DETECTION NE PEUT DONC PAS ETRE +4,7 mV/H.	123
FIGURE 3-25 : SCHEMA EXPLICATIF DU TRAITEMENT DE DONNEES UTILISE. A PARTIR DE LA DONNEE BRUTE (LE POTENTIEL) ON OBTIENT UN VECTEUR COMPOSE DE MODULES CALCULES A PARTIR DE DEUX TRANSFORMEES DE FOURIER. L'ENSEMBLE DES MODULES CORRESPONDANT AUX FREQUENCES CHOISIES PERMET DE CONSTRUIRE UN DESCRIPTEUR, DEFINISSANT LA BACTERIE DETECTEE EN FONCTION DE L'ELECTRODE ET DE SON MATERIAU.....	127
FIGURE 3-26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODE DE CLASSIFICATION SVM GRACE A UN CLASSIFIEUR (SVC) A KERNEL LINEAIRE (A.) ET A KERNEL NON LINEAIRE (B.).....	130
FIGURE 3-27 : PRINCIPE DE LA VALIDATION CROISEE « CLASSIQUE ». L'ENSEMBLE DE TEST REPRESENTE 20 % DE LA BASE DE DONNEES TOTALE, LE PROCEDE N'EST REPETE QUE 5 FOIS.....	132
FIGURE 3-28 : PRINCIPE DE LA VALIDATION CROISEE LOBO. L'ENSEMBLE DE TEST REPRESENTE UNE UNIQUE EXPERIENCE, LE PROCEDE EST REPETE AUTANT DE FOIS QUE LE NOMBRE D'EXPERIENCES PRESENTES DANS TOUTES LA BASE DE DONNEES.	133
FIGURE 3-29 : PERFORMANCE DE CLASSIFICATION AU GRAM ET AU GENRE EN FONCTION DU TEMPS POST DETECTION. LE GRAM EST RAPIDEMENT CORRECTEMENT IDENTIFIE TANDIS QUE LE GENRE BACTERIEN NECESSITE PLUS D'INFORMATIONS POUR ETRE DETERMINE.	134
FIGURE 3-30 : MATRICE DE CONFUSION, AU GENRE, DES BACTERIES IDENTIFIEES, 465 MINUTES (7 H 45) APRES DETECTION.....	136
FIGURE 3-31 : PERFORMANCE DE CLASSIFICATION AU GENRE EN FONCTION DU TEMPS POST DETECTION POUR LES BACTERIES A GRAM NEGATIF. LE GRAM EST IDENTIFIE EN 5 H 45. LES DONNEES JUSQU'A CETTE BORNE TEMPORELLE SONT SUFFISANTES POUR IDENTIFIER LE GENRE (DANS LES GRAM NEGATIF) AVEC 85 % DE PRECISION.....	137
FIGURE 3-32 : PERFORMANCE DE CLASSIFICATION AU GENRE EN FONCTION DU TEMPS POST DETECTION ET EN FONCTION DES DIFFERENTS MATERIAUX D'ELECTRODES.....	138
FIGURE 4-1 : COURBES POTENTIOMETRIQUES ET PROFILS DE DERIVEE LISSEE DE POTENTIEL POUR UNE ELECTRODE DE POLYANILINE, OBTENUES PENDANT UNE CROISSANCE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> , DANS 5 MILIEUX DIFFERENTS (BACT/ALERT® + SANG HUMAIN	

TOTAL, BACT/ALERT® + SANG HUMAIN TOTAL VIEILLI 5 JOURS, BACT/ALERT® + SANG DE CHEVAL DEFIBRINE, BACT/ALERT® SEUL, TSB SEUL), A 37°C ET 90 RPM.	142
FIGURE 4-2 : COURBES POTENTIOMETRIQUES D'ÉLECTRODES EN POLYANILINE POUR DES CULTURES D' <i>E. COLI</i> (ATCC 8739) SOUS DIFFÉRENTES CONDITIONS D'INCUBATION (T° ET AGITATION). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS.	146
FIGURE 4-3 : (GAUCHE) PHOTO D'UN FLACON « CLASSIQUE », SANS SANG POUR PLUS DE VISIBILITE, AVEC LE CAPTEUR EN POSITION « AU FOND DU FLACON ». (DROITE) PHOTO DU FLACON UTILISE POUR UNE MESURE POTENTIOMETRIQUE DANS LE SURNAGEANT, SANS AGITATION.	147
FIGURE 4-4 : RAPPEL VISUEL DE LA DIFFÉRENCE DE TAILLE ET DE GEOMETRIE ENTRE UNE ELECTRODE DE TRAVAIL ET LA CONTRE ELECTRODE SUR LA PLATEFORME UTILISEE.	148
FIGURE 4-5 : COMPARAISON DES COURBES POTENTIOMETRIQUES, POUR CHAQUE MATERIAU, ENTRE UNE ELECTRODE STANDARD ET UNE ELECTRODE A GRANDE SURFACE (AUGMENTATION D'UN FACTEUR 19) PENDANT UNE CROISSANCE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC 8739). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	149
FIGURE 4-6 : SCHEMA EXPLICATIF (A.) ET PHOTO (B.) DU PROTOTYPE DE FLACON COMPARTIMENTE PERMETTANT UNE MESURE ELECTROCHIMIQUE DUALE DE LA SIGNATURE POTENTIOMETRIQUE DES BACTERIES INOCULEES DANS UN COMPARTIMENT CONTAMINE ET LA DETECTION D'ESPECES REDOX OU DE VARIATIONS DE PH DANS UN COMPARTIMENT STERILE.	151
FIGURE 4-7 : COURBES POTENTIOMETRIQUES DES ELECTRODES EN POLYANILINE ET EN OXYDE D'IRIDIUM PLACEES DANS DEUX COMPARTIMENTS : L'UN AVEC CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> (ATCC 25922) ET L'AUTRE STERILE. HEMOCULTURE DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 60 RPM.	153
FIGURE 4-8 : COURBES POTENTIOMETRIQUES DES ELECTRODES EN POLYANILINE ET EN OXYDE D'IRIDIUM PLACEES DANS LE COMPARTIMENT STERILE APRES CONTAMINATION PAR <i>E. COLI</i> (ATCC 25922). HEMOCULTURE DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 60 RPM.	154
FIGURE 4-9 : PROCESSUS DE MESURE POUR LES FLACONS UTILISANT LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE (<i>POTENTIO = MESURE POTENTIOMETRIQUE, EIS = SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE</i>). GRACE AU MULTIPLEXEUR LES MESURES SONT SUCCESSIVES. UNE SEULE ELECTRODE DE CHAQUE MATERIAU EST UTILISEE POUR LES MESURES D'IMPEDANCES, CECI PERMET D'ETUDIER L'INFLUENCE DE CETTE MESURE SUR LA DETECTION PAR POTENTIOMETRIE.	157
FIGURE 4-10 : COURBES POTENTIOMETRIQUES OBTENUES POUR UNE CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> , AVEC ET SANS MESURE D'IMPEDANCE AVANT LA MESURE DU POTENTIEL. HEMOCULTURE DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 20°C, 100 RPM. ENCADRE : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL DES ELECTRODES D'OXYDE D'IRIDIUM.	158
FIGURE 4-11 : ÉVOLUTION DES DIAGRAMMES DE NYQUIST (ENTRE 1 KHz ET 0,1 Hz) POUR LA POLYANILINE PENDANT LA CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> ET PENDANT UN NEGATIF. UN GRAPHE EST TRACE TOUTES LES 10 H. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 20°C, 100 RPM.	159
FIGURE 4-12 : ÉVOLUTION DES DIAGRAMMES DE NYQUIST (ENTRE 1000 Hz ET 0,1 Hz) POUR LA POLYANILINE PENDANT LA CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> ET PENDANT UN NEGATIF. UN GRAPHE EST TRACE TOUTES LES 2 H ENTRE 20 H ET 30 H D'INCUBATION. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 20°C, 100 RPM.	160
FIGURE 4-13 : DIAGRAMMES DE BODE DE L'ÉLECTRODE DE POLYANILINE EN FONCTION DE LA FREQUENCE DE MESURE (ENTRE 0,1 ET 1 KHz), PENDANT LA CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> (UN POINT TOUTES LES 2 HEURES, FOCUS SUR 4 INSTANTS TEMPORELS PRECIS). HEMOCULTURE DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 20°C, 100 RPM.	161

FIGURE 4-14 : EVOLUTION DU MODULE NORMALISE (COLONNE DE GAUCHE) ET DE LA PHASE (COLONNE DE DROITE) DE L'IMPEDANCE OBTENUS A 0,1 HZ EN FONCTION DU TEMPS, POUR UNE CROISSANCE D'E. COLI ET POUR UN NEGATIF, POUR LES 4 MATERIAUX D'ELECTRODES. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 20°C, 100 RPM.	163
FIGURE 4-15 : COURBES DE LA DERIVEE LISSEE DU MODULE DE L'IMPEDANCE OBTENUES A 0,1 HZ ET DE LA DERIVEE LISSEE DU POTENTIEL POUR UNE CROISSANCE D'E. COLI. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 20°C, 100 RPM.....	164
FIGURE 4-16 : PHOTO D'UNE PLATEFORME ELECTROCHIMIQUE APRES CROISSANCE D'E. COLI PUIS RINÇAGE A L'EAU DEIONISEE. GROSSISSEMENT X2500, MICROSCOPE KEYENCE VHX-7000.	165
FIGURE C-1 : SCHEMA D'ANALYSE SIMPLIFIEE D'UNE HEMOCULTURE EFFECTUEE PAR LES METHODES CLASSIQUES ET PAR NOTRE METHODE (TEMPS DE TRANSPORT LONG = 15 H ¹ / TEMPS D'INCUBATION = 10 H).	171
FIGURE C-2 : SCHEMA DU PRINCIPE MICROFLUIDIQUE IMAGINE POUR ISOLER LES METABOLITES BACTERIENS PRODUITS PAR LA COUCHE BASALE DU BIOFILM.....	173
FIGURE C-3 : PERSPECTIVES POUR LA SUITE DE CE DOCTORAT AVEC DIFFERENTS AXES ENVISAGES.	174
FIGURE C-4 : SCHEMAS DE PRINCIPE D'UN BOUCHON INSTRUMENTE AVEC UNE TIGE, OU SONT PLACEES DEUX ELECTRODES PERMETTANT LA MESURE. FIGURES 3A ET 3B DU BREVET FR2208762.	177
FIGURE A-1 : COURBES POTENTIOMETRIQUES OBTENUES POUR UNE EXPERIENCE DITE NEGATIVE, PENDANT 3 SEMAINES (504 HEURES). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT FA PLUS, 37°C, 90 RPM. L'ELECTRODE DE TRAVAIL WE1 (POLYANILINE) A EU UN PROBLEME DE CONNECTIQUE, ELLE A ETE ENLEVEE DU GRAPHIQUE.	179
FIGURE A-2 : COURBES DE DERIVEES LISSEES DU POTENTIEL AVEC LA POLYANILINE POUR 3 SOUCHES D'E. COLI. L'ENSEMBLE DES EXPERIENCES EST REPRESENTE, AVEC LES INOCULUMS ET L'ELECTRODE DE TRAVAIL ASSOCIES. HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT® FA PLUS, 37°C, 90 RPM.....	179
FIGURE A-3 : COURBES POTENTIOMETRIQUES OBTENUES POUR UNE CROISSANCE DE 52 CFU D'E. COLI (ATCC 8739). HEMOCULTURES DE SANG HUMAIN DANS LE BACT/ALERT FA PLUS, 37°C, 90 RPM.	187
FIGURE A-4 : (A.) MODELE 3D D'UN DESIGN POSSIBLE D'UNE AIGUILLE PRESENTANT 2 TRANCHEES, REALISE PAR MEHRSA RAFIE JIRDEHI. (B.) UTILISATION DE CETTE AIGUILLE IMPRIMEE EN 3D PAR SLA DANS UN FLACON D'HEMOCULTURE AVEC SANG HUMAIN. (C.) DESIGN D'UNE PLATEFORME ELECTROCHIMIQUE PERMETTANT D'INSTRUMENTER DES FLACONS D'HEMOCULTURE BACT/ALERT®, REALISE PAR CHARLES CHATARD.	189
FIGURE A-5 : MODELE 3D D'UN SYSTEME PERMETTANT LA FERMETURE ET LA REPRISE DE CONTACT D'UNE AIGUILLE INSTRUMENTEE, REALISE PAR MEHRSA RAFIE JIRDEHI. (A.) UTILISATION D'UN FILETAGE INTERNE DANS L'AIGUILLE. (B.) BOUCHON AVEC REPRISE DE CONTACT EN METAL PERMETTANT LA CONNECTIQUE DE 2 FILS.	191
FIGURE A-6 : POTENTIELS EN mV DE DEUX ELECTRODES DE POLYANILINE, POUR UNE CULTURE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET POUR UN NEGATIF, DANS 40 mL DE MILIEU BACTEC™ MYCO/F LYTIC (BECTON DICKINSON), A 37°C ET 90 RPM.	194

Liste des tableaux

TABLEAU 1-1 : RECAPITULATIF DES FORCES ET FAIBLESSES DES TECHNOLOGIES DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION BACTERIENNE ADAPTEES AUX HEMOCULTURES.....	49
TABLEAU 2-1 : RESUME DU CAHIER DES CHARGES ET DES SOLUTIONS CHOISIES CONCERNANT LE PROTOTYPE DE FLACON D'HEMOCULTURE INSTRUMENTE.....	74
TABLEAU 2-2 : FREQUENCES D'OCCURRENCE DES ESPECES OU GROUPES BACTERIENS ISOLEES A PARTIR D'HEMOCULTURES DE PATIENTS HOSPITALISES AUX ÉTATS-UNIS EN 2002 D'APRES KARLOWSKY ET AL ²⁸	85
TABLEAU 3-1 : COMPARATIF DES TEMPS DE DETECTION (TTP) CALCULES POUR DIFFERENTES ESPECES BACTERIENNES ENTRE LE BACT/ALERT® VIRTUO ⁵ ET NOTRE DISPOSITIF.....	125
TABLEAU 3-2 : NOMBRE DES PREMIERES FREQUENCES CHOISIES, POUR LA FFT DU POTENTIEL LISSE ET POUR LA FFT DE LA DERIVEE LISSEE, POUR CHAQUE MATERIAU D'ELECTRODE. AVEC LE TRAITEMENT DE DONNEES UTILISE, CES 59 FREQUENCES SUFFISENT A DISCRIMINER LES BACTERIES TESTEES.	129
TABLEAU 4-1 : TEMPS DE DETECTION (TTP), CALCULES A PARTIR DE LA FIGURE 3-11, POUR UNE CROISSANCE D' <i>E. COLI</i> (ATCC 25922) DANS DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE.	142
TABLEAU 4-2 : RESULTATS POSSIBLES CONCERNANT LES SIGNAUX POTENTIOMETRIQUES ENREGISTRES DANS LE COMPARTIMENT STERILE ET LEURS CONCLUSIONS ASSOCIEES.....	152
TABLEAU 4-3 : PRINCIPES ENVISAGES POUR L'ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE DU COMPORTEMENT DU DISPOSITIF DEVELOPPE.....	156
TABLEAU C-1 : CARACTERISTIQUES ENVISAGEABLES DU DISPOSITIF DEVELOPPE PENDANT CE DOCTORAT.	171
TABLEAU A-1 : ENSEMBLE DES EXPERIENCES UTILISEES POUR L'IDENTIFICATION PAR APPRENTISSAGE ARTIFICIEL.....	183
TABLEAU A-2 : QUELQUES AVANTAGES, LIMITES ET EVENTUELLES SOLUTIONS, DU FLACON INSTRUMENTE VIS-A-VIS DE SON IMPACT ENVIRONNEMENTAL.	186

Résumé

L'hémoculture est le test de référence pour détecter les infections (bactériennes ou fongiques) du sang, des pathologies très répandues et potentiellement fatales. Le délai entre l'apparition des symptômes et l'administration d'un traitement adapté est donc une donnée cruciale. Pour effectuer une hémoculture, un équipement lourd et coûteux est nécessaire mais n'offre qu'une réponse binaire (infecté ou stérile) sur l'état du sang prélevé. Le temps de transport entre le lieu de prélèvement et le laboratoire est un temps perdu pour le diagnostic, entraînant un retard dans les choix thérapeutiques. Cette thèse a cherché à évaluer l'intérêt du suivi électrochimique d'une d'hémoculture. Dans un premier temps, un prototype de flacon instrumenté par un réseau de capteurs électrochimiques a été développé. De nombreuses espèces bactériennes et fongiques ont pu ainsi être testées.

Les mesures potentiométriques obtenues ont permis d'obtenir une réponse multiparamétrique, assurant la détection sans avoir recours à un automate centralisé et complexe. De plus, ces signaux ont pu être exploités par apprentissage machine afin d'identifier le pathogène détecté, sans manipulation ou réactif chimique. Cette technologie permettrait donc de valoriser le temps de transport et d'automatiser les premières étapes d'identification pour générer un diagnostic pertinent dans les meilleurs délais.

Les derniers travaux effectués pendant ce doctorat ont permis d'étudier les phénomènes biologiques et chimiques mis en jeu lors de la détection et l'identification. Ces résultats ouvrent la voie à de nombreuses applications et thématiques de recherche, notamment dans le domaine des biofilms bactériens.

Mots clés : *Hémoculture, Diagnostic, Capteurs électrochimiques, Apprentissage machine, Identification sans marquage*

Abstract

Development of electrochemical sensors for bloodstream infection diagnosis

Blood culture is the gold standard for detecting bloodstream infections, which are widespread and potentially fatal. The time between the appearance of symptoms and the administration of appropriate treatment is therefore crucial. To perform a blood culture, cumbersome and expensive equipment is required but only offers a binary answer (infected or sterile) on the condition of the collected blood. The transport time between the collection site and the laboratory is time lost for diagnosis, resulting in a delay in therapeutic choices.

This thesis aimed at evaluating the interest of electrochemical monitoring of a blood culture. First, a prototype of blood culture bottle instrumented by an electrochemical sensor array was developed. Many bacterial and fungal species were tested.

The potentiometric measurements provided a multiparametric response, ensuring the detection without having to use a centralized and complex automaton. Moreover, these signals could be exploited by machine learning in order to identify the detected pathogen, without manipulation or chemical reagent. This technology would thus allow to valorize the transport time and to automate the first steps of identification to generate a relevant diagnosis in the shortest time.

The last works carried out during this thesis allowed to study the biological and chemical phenomena involved during the detection and identification. These results open the way to numerous applications and research themes, particularly in the field of bacterial biofilms.

Keywords: *Blood culture, Diagnosis, Electrochemical sensors, Machine Learning, Label-free identification*

Glossaire

AST / Antimicrobial Susceptibility Testing

Etape du processus de diagnostic d'une infection consistant à soumettre le pathogène (isolé à partir du milieu de culture) à différents antibiotiques. La perturbation de la croissance du micro-organisme est analysée afin d'établir la stratégie antimicrobienne la plus adaptée au patient.

ATCC / American Type Culture Collection

Société privée américaine spécialisée dans la caractérisation des lignées de cellules (bactéries et champignons notamment). Une souche de référence peut être commandée à cette entreprise, elle sera numérotée ce qui permet aux chercheurs de pouvoir comparer des résultats avec des souches strictement identiques.

BSL / BioSafety Level

Ensemble des précautions nécessaires pour isoler et/ou manipuler des agents pathogènes en laboratoire. Les niveaux BSL varient de BSL-1 à BSL-4.

CE / Contre-Electrode

Dans une cellule électrochimique à trois électrodes, la contre-électrode permet de fermer le circuit et ainsi le passage du courant.

CFU / *Colony Forming Unit* ou UFC / *Unité Formant Colonie*

Unité couramment utilisée en microbiologie, correspondant à la quantité de micro-organismes nécessaire pour former une colonie une fois étalée sur boîte de Petri.

DTBS / Département micro-Technologies pour la Biologie et la Santé

EIS / *Electrochemical Impedance Spectroscopy*

La spectroscopie d'impédance électrochimique permet d'étudier la réponse temporelle des déplacements de charges et des transferts de charges qui se produisent dans un système lors de l'application d'un potentiel alternatif de faible amplitude sur une plage de fréquences définie.

ESKAPE / *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp*

Acronyme faisant référence à 6 pathogènes dont la virulence et l'antibiorésistance (le fait « d'échapper » à de nombreuses stratégies antimicrobiennes) ne font que croître.

EUCAST / *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Comité scientifique, créé en 1977, chargé d'étudier les aspects techniques des tests aux antimicrobiens (veille scientifique, bonnes pratiques, protocoles...).

IrOx / Oxyde d'iridium

LOBO / *Leave-One-Bottle-Out*

Méthode de validation croisée utilisée pour identifier les bactéries au genre grâce à leurs signatures électrochimiques.

MALDI-TOF / *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight Mass Spectrometry*

Méthode d'identification des micro-organismes utilisant le temps de vol de certaines molécules cibles comme « carte d'identité » de l'agent pathogène.

McF / Normes McFarland

Unité couramment utilisée en microbiologie pour mesurer la turbidité d'une suspension de micro-organismes. Une valeur de 0,5 McF correspond généralement à une concentration de $2 \cdot 10^8$ cfu/mL pour une souche bactérienne et à $2 \cdot 10^6$ cfu/mL pour une souche de levure. L'équivalent d'une solution à 0,5 McF est une absorbance (à 600 nm) comprise entre 0,8 et 0,12. Le suivi de la croissance bactérienne peut donc s'effectuer via une mesure de la densité optique du milieu de culture.

NCIMB / *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria*

Collection de cultures de micro-organismes. Au même titre que les souches ATCC, une souche de référence provenant de la NCIMB sera étiquetée par un numéro permettant de reproduire résultats et protocoles.

NCTC / *National Collection of Type Cultures*

Collection de cultures de micro-organismes gérées par *Public Health England* (une agence du département de la santé britannique). Au même titre que les souches ATCC et NCIMB, une souche de référence de la **NCTC** sera étiquetée avec un numéro unique.

OCP / *Open Circuit Potential*

La mesure potentiométrique en circuit ouvert d'une cellule électrochimique correspond à la mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes (généralement une électrode de travail et une électrode de référence).

OMS / Organisation Mondiale de la Santé

PANI / Polyaniline

REF / Electrode de référence

Electrode utilisée en raison de son potentiel défini. Elle permet de mesurer (ou d'imposer) une différence de potentiel par rapport à une seconde électrode (électrode de travail). L'électrode de référence doit être choisie afin d'être le plus stable possible dans l'électrolyte étudié.

SVM / Support Vector Machine

Méthode de classification permettant de séparer un ensemble de données en deux classes (minimum) grâce à un hyperplan, calculé de manière à obtenir une séparation qui engendrera une marge maximale entre les classes.

TSA / Tryptic Soy Agar

Milieu de culture gélosé classiquement utilisé en microbiologie. Sa composition (pour 1 L d'eau distillée) est la suivante : 15 g de Tryptone + 5 g de Peptone de soja + 5 g de Chlorure de sodium + 15 g d'Agar. Son pH est situé entre 7,5 et 7,1.

TSB / Tryptic Soy Broth

Milieu de culture liquide classiquement utilisé en microbiologie. Sa composition (pour 1 L d'eau distillée) est la suivante : 17 g de Tryptone + 3 g de Peptone de soja + 5 g de Chlorure de sodium + 2,5 g de Dextrose + 2,5 g de Phosphate bipotassique d'hydrogène. Son pH est situé entre 7,5 et 7,1.

TTP / Time-To-Positivity

Temps nécessaire à une culture (ici une hémoculture) pour être catégorisée comme positive, c'est-à-dire pour affirmer que des micro-organismes sont présents dans l'échantillon.

WE / Working Electrode

Dans une cellule électrochimique, l'électrode de travail est l'électrode où le transfert de charges est étudié.

Introduction générale

Le sang humain est un liquide physiologique en temps normal totalement stérile. Cependant des micro-organismes peuvent pénétrer dans le sang via une infection locale (lésion de la peau, ingestion d'aliments contaminés...) ou un traitement médical (chirurgie, pose d'un cathéter ...). La répétition et/ou la prolongation de cette incursion de micro-organismes peut provoquer une infection sanguine, si la réponse du système immunitaire n'est pas suffisante. On recense environ 30 millions d'infections sanguines chaque année dans le monde^{1,2}. C'est une pathologie répandue mais également potentiellement fatale.

La prise en charge thérapeutique d'une infection sanguine repose sur la prescription d'antibiotiques, d'abord à large spectre, puis ciblés une fois le pathogène identifié. Cette stratégie occasionne donc un délai pendant lequel le patient est traité avec une antibiothérapie probabiliste et des molécules potentiellement peu ou pas adaptées à sa pathologie.

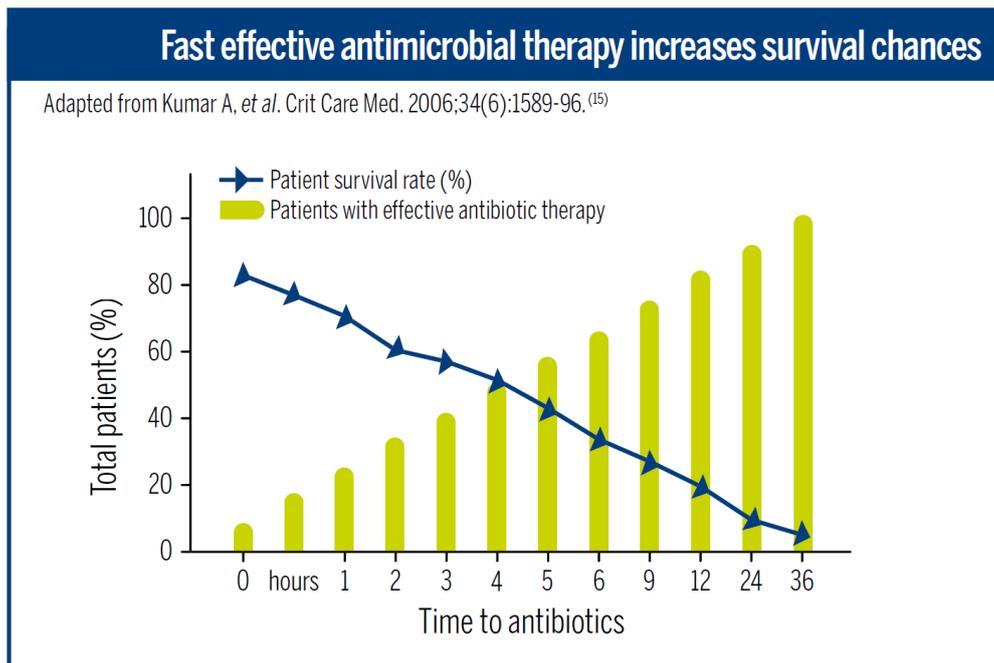


Figure I-1 : Taux de survie des patients souffrant d'une infection sanguine et pourcentage des patients traités avec une antibiothérapie adaptée en fonction du temps de prise en charge (adapté de la brochure de bioMérieux « Blood Culture : A key investigation for diagnosis of bloodstream infections »³).

Un diagnostic rapide permet d'améliorer significativement les chances de survie du patient³ (**Figure I-1**) mais également de limiter un processus biologique bien connu et de plus en plus menaçant pour la santé mondiale : l'antibiorésistance. Responsable de plus d'un million de décès dans le monde en 2019, la recrudescence de germes bactériens résistants aux antibiotiques pourrait tuer 10 millions de personnes chaque année avant 2050^{4,5}, soit plus que le cancer.

Du fait de la très faible biomasse présente dans la prise de sang (quelques cellules à peine), il est nécessaire, pour dépister une contamination bactérienne (ou fongique), de placer les micro-organismes à détecter dans des conditions favorables à leur prolifération. Ainsi, à partir d'une unique cellule, les microbes (bactéries ou champignons) se multiplieront jusqu'à atteindre des concentrations aisément détectables, par un automate ou un œil humain. La mise en culture d'une prise de sang pour en déceler les éventuels micro-organismes se nomme hémoculture. Il s'agit d'un test de stérilité, sans *a priori* sur la nature et le nombre des micro-organismes à détecter : la présence d'une seule cellule bactérienne ou fongique suffit à rendre le test positif.

Le XX^{ème} siècle a été une période dynamique dans le domaine des avancées technologiques pour l'hémoculture. Les procédés de détection, la sensibilité des capteurs/outils de détection et la fertilité des milieux de culture ont été améliorés. En effet, le développement d'une hémoculture rapide et à bas coût représente un enjeu majeur en terme de santé publique :

- ➔ Le taux de survie des patients serait amélioré grâce à la prescription plus rapide d'un traitement adapté ;
- ➔ L'apparition de « super-bactéries », résistantes à presque toutes les stratégies antimicrobiennes, pourrait potentiellement être retardée ;
- ➔ La technologie pourrait s'exporter dans les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire, foyers de l'antibiorésistance et qui représentent une grande majorité des infections sanguines à l'échelle mondiale, afin de déployer une méthodologie accessible permettant de détecter et circonscrire les foyers infectieux.

Le suivi des hémocultures repose la plupart du temps sur une détection des métabolites émis par les micro-organismes en croissance. Du fait, de la difficulté à déceler optiquement ces métabolites dans le sang, même dilué, c'est dans une phase hétérogène adjacente, phase solide ou phase gazeuse, qu'est typiquement réalisée la détection de métabolites microbiens. En opposition à cette approche classique, cette thèse vise à étudier l'intérêt d'un suivi de l'hémoculture directement dans la phase liquide, complexe, par des mesures électrochimiques. En outre, alors que les méthodes conventionnelles reposent sur le suivi d'un seul paramètre, typiquement la génération de CO₂ ou la

pression globale, le présent manuscrit montre le bénéfice à réaliser un suivi multiparamétrique de l'hémoculture, de manière à extraire une « empreinte » électrochimique. Ainsi, l'instrumentation du flacon d'hémoculture par un réseau de capteurs électrochimiques assure non seulement la détection du micro-organisme responsable de l'infection mais rend également possible son identification, le tout sans requérir la manipulation du sang infecté par une intervention humaine ni ajout de réactifs. De par l'approche applicative du sujet, les problématiques d'industrialisation et d'utilisation (notamment en milieux isolés) ont été prises en compte.

Le **Chapitre 1** de ce manuscrit est un chapitre introductif fournissant une revue des différentes méthodes développées pour détecter et identifier la présence d'un pathogène (bactérien ou fongique) dans le sang d'un patient. Les avancées et limites des technologies existantes et en développement seront discutées afin d'établir un paysage exhaustif du domaine du diagnostic des bactériémies. Dans un second temps, les méthodes électrochimiques de détection et d'identification de bactéries dans différents milieux seront présentées avec un intérêt particulier sur les limites de détection et l'applicabilité au milieu clinique de ces mesures.

Après quelques rappels théoriques concernant les bactéries et les méthodes électrochimiques, notamment pour étudier les variations du pH d'une solution, le **Chapitre 2** détaille les choix expérimentaux et la mise en place du banc de mesure utilisé dans la majorité des expériences réalisées pendant ce doctorat.

Le **Chapitre 3** étudie la potentiométrie comme méthode de détection de croissance bactérienne dans une matrice biologique complexe tel que le sang humain total. Cette étude débute par l'exposition des réponses en potentiel de quatre matériaux d'électrodes puis s'intéresse à un polymère conducteur en particulier (la polyaniline) afin de détecter des signatures électrochimiques spécifiques à différentes espèces bactériennes. Le chapitre conclut par la mise à profit de l'apprentissage artificiel (*machine learning*) pour identifier la bactérie en croissance à partir du potentiel enregistré.

Enfin, le **Chapitre 4** se concentre sur l'investigation des phénomènes chimiques et/ou biologiques à l'origine des signatures électrochimiques spécifiques observées précédemment. Une hypothèse concernant la création d'un biofilm bactérien à la surface des électrodes est particulièrement étudiée, par spectroscopie d'impédance notamment.

Les résultats de la thèse sont ensuite résumés dans la **Conclusion générale et perspectives**. Les performances, particulièrement intéressantes, obtenues concernant la détection mais également l'identification bactérienne, permettent d'imaginer de nombreuses applications dont certaines ont déjà fait l'objet de preuves de concepts.

Chapitre 1

Etat de l'art sur le test d'hémoculture et le contexte de la thèse

1. Le test d'hémoculture

Le sang est un liquide physiologique composé de plasma et de cellules appelées éléments figurés du sang. Le sang sain, à l'instar de l'urine et du liquide cébrospinal, est un liquide stérile, c'est-à-dire que sa mise en culture ne produit aucune croissance de micro-organismes (bactéries ou levures). Cette caractéristique permet de détecter facilement un sang infecté par un test de stérilité, l'hémoculture. Son principe est simple : un échantillon de sang est prélevé sur le patient, puis mis en culture dans un milieu nutritif favorisant la croissance de microbes, à une température permettant cette croissance (située entre 34 et 37°C). Cette culture est nécessaire pour augmenter la biomasse des micro-organismes, biomasse très faible dans le corps du patient (parfois 10^{-2} cfu*/mL) malgré des symptômes potentiellement très graves¹. En effet, en médiane chez l'adulte, une concentration de 1 cfu par millilitre de sang est retrouvée pour une infection sanguine.

On appelle bactériémie une infection sanguine causée par une bactérie, alors qu'une fongémie sera causée par une levure dans le sang.

1.1. Contexte

1.1.1. Les bactériémies dans le monde

Les infections sanguines sont un problème de santé mondial : on estime à plus de 30 millions le nombre d'épisodes de bactériémies par an dans le monde, entraînant 6 millions de décès^{2,3}. Non traitée, une bactériémie peut conduire à une septicémie (ou sepsis) puis à un choc septique. Le taux de mortalité d'un sepsis est très élevé, entre 25 et 50 %. Selon l'Organisation mondiale de la santé, les septicémies sont responsables de près de 20 % de tous les décès dans le monde⁴. La majorité des infections sanguines sont mono-microbiennes, ce qui facilite l'identification du pathogène responsable, mais les

* La valeur de 1 cfu (*Colony Forming Unit*) correspond à la quantité de bactéries nécessaire pour former une colonie une fois étalées sur boîte de Petri.

infections polymicrobiennes, plus complexes à traiter, représentent jusqu'à 30 % des bactériémies chez certaines populations⁵.

Un diagnostic complet est souvent beaucoup plus long que la durée pendant laquelle la décision thérapeutique doit être prise par le praticien. C'est cette différence qui conditionne l'utilisation d'antibiotiques à large spectre dans le but de gagner du temps jusqu'à la détermination du traitement le plus adapté.

Malheureusement, dans 20 % des cas de sepsis, le traitement initial est inapproprié, ce qui augmente fortement le taux de mortalité pour ces patients^{6,7}. Cette étude de Kumar *et al.*⁸ rapporte même une multiplication du taux de mortalité par un facteur 5 chez les patients avec une mauvaise stratégie antimicrobienne. En plus de cette conséquence, potentiellement létale, à court terme, l'utilisation d'une antibiothérapie peu ou pas adaptée favorise la sélection de souches bactériennes antibiorésistantes.

En 2019, plus de la moitié des souches de *Staphylococcus aureus* isolées étaient résistantes à la méthicilline dans de très nombreux pays telles que la Chine, l'Inde mais également les Etats-Unis (**Figure 1-1**). L'antibiorésistance est donc une réalité proche géographiquement.

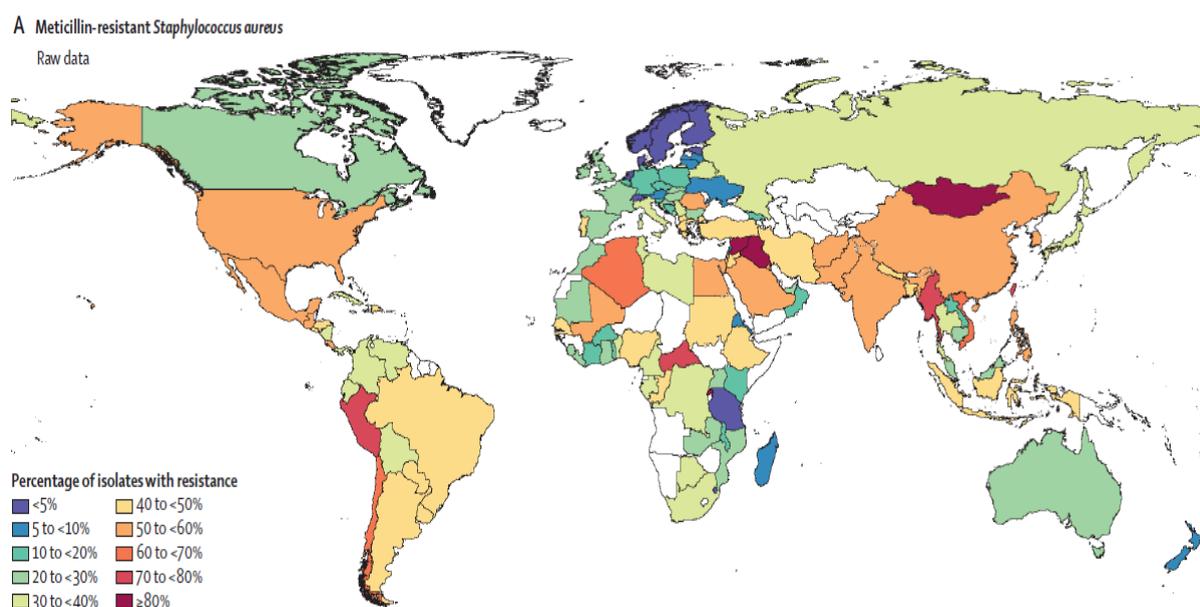


Figure 1-1 : Carte du monde avec pourcentage d'isolats de MRSA (*Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*) par pays en 2019⁹.

Il existe des organismes nationaux et internationaux, tels que l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), spécialisés dans la surveillance de ces souches antibiorésistantes ainsi que dans les bonnes pratiques hospitalières pour limiter leur prolifération¹⁰. Pourtant, force est de constater que la résistance aux antibiotiques progresse toujours, au point d'être qualifiée par l'OMS de "l'une des plus grandes menaces pour la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le

développement aujourd'hui¹¹. Une étude récente fait état de plus de 1,27 million de décès directement causés par la résistance aux antimicrobiens en 2019 ; ce nombre pourrait atteindre 10 millions chaque année d'ici 2050⁹.

Deux enjeux principaux coexistent dans le milieu de la microbiologie clinique :

A court et moyen terme La mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de soigner des infections résistantes aux médicaments actuellement utilisés. Plusieurs voies sont explorées, on peut citer l'utilisation de peptides antimicrobiens (les bactériocines RumC¹² par exemple), de molécules ciblant des mécanismes bactériens particuliers¹³ (tels l'adhésion et la virulence), ou même de virus tueurs de bactéries (les bactériophages¹⁴).

A moyen et long terme La réduction du temps entre le prélèvement et les résultats d'identification de la bactérie, et de l'antibiogramme associé, permettant le choix précoce de l'antibiotique le plus adapté pour soigner le patient. On cherche ainsi à limiter l'apparition de mécanismes d'antibiorésistances.

Cette thèse s'est concentrée particulièrement sur ce dernier enjeu de réduction du temps entre prélèvement et identification du ou des pathogènes détectés.

1.1.2. Prise en charge des bactériémies

Pour bien comprendre le cahier des charges d'une hémoculture, il faut connaître la chronologie du diagnostic d'une bactériémie. Une frise simplifiée est présentée **Figure 1-2**.



Figure 1-2 : Schéma chronologique simplifié du diagnostic d'une bactériémie à l'hôpital. Le temps de transport dépend de l'heure et du lieu de prélèvement tandis que le temps d'incubation dépend de l'espèce bactérienne (ou fongique) présente dans le sang du patient. L'identification peut se faire au mieux en 1 h par MALDI-TOF directement sur culot d'hémoculture mais nécessite habituellement une sous-culture sur boîte de Petri pour isoler le micro-organisme. L'antibiogramme, ou AST (pour *Antimicrobial Susceptibility Testing*), peut se faire en quelques heures en phase liquide ou en 24 h sur gélose, suivant l'automate utilisé.

Lorsque qu'un médecin suspecte une infection sanguine d'origine bactérienne ou fongique chez son patient, il prescrit une hémoculture. Le sang du patient (environ 10 mL) est prélevé avec toutes les précautions nécessaires pour éviter une contamination de l'échantillon par la flore cutanée du patient. En général, deux flacons sont remplis, un spécifique à la croissance des micro-organismes aérobies, l'autre spécifique aux micro-organismes anaérobies.

Cette précaution, ainsi que la multiplication des prélèvements, permet d'éviter les faux négatifs dus à la faiblesse des charges bactériennes à détecter : moins de 0,1 cfu/mL pour 25 % des patients¹.

De plus la majorité des bactéries pathogènes se développent dans les deux milieux (plus rapidement dans l'un que dans l'autre) donc si uniquement un flacon ressort positif il s'agit probablement d'une contamination et donc d'un faux positif.

Les flacons sont ensuite transportés, à température ambiante, vers le laboratoire de microbiologie le plus proche. Ce temps de transport peut varier de quelques minutes à plusieurs dizaines d'heures¹⁵. Au laboratoire, les flacons d'hémoculture sont mis en culture, à une température de 35°C (\pm 2°C) et sous agitation.

Une fois la présence d'une infection confirmée, des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'espèce du pathogène. Parmi les analyses couramment utilisées on retrouve la coloration de Gram, la culture sur boîtes de Petri chromogènes ou encore la spectrométrie de masse par analyse de temps de vol (MALDI-TOF). Ces différentes méthodes d'identification sont détaillées plus loin dans ce chapitre.

Enfin, une fois le micro-organisme identifié, un antibiogramme est effectué afin de déterminer l'antibiothérapie la plus adaptée au patient. La culture sur gélose, où sont disposés des disques imprégnés d'antibiotiques (méthode *Kirby-Bauer*¹⁶), est la méthode classiquement utilisée mais des antibiogrammes directement en phase liquide, plus rapides (résultats en quelques heures), sont à présent disponibles sur le marché, comme les systèmes VITEK®2 et Specific Reveal® de bioMérieux^{17,18}.

Pour une bactérie dont la croissance est détectée en 10 heures d'incubation, il est possible de donner des frises chronologiques du diagnostic en fonction de l'heure de prélèvement. La **Figure 1-3** représente 2 cas couramment observés en milieu hospitalier : un prélèvement le matin d'un jour de semaine et un prélèvement le soir d'un jour de semaine (basés sur notre connaissance des pratiques hospitalières).

On remarque que le temps de diagnostic dépend fortement du temps de transport¹⁹ et de la présence de techniciens de laboratoire pour effectuer les gestes nécessaires à l'utilisation des automates^{19,20}. Entre deux patients prélevés la même journée, on obtient des durées d'identification et de diagnostic complet (avec antibiogramme) très différentes. Cette disparité est d'autant plus renforcée dans le cas des hémocultures pendant les week-ends où les laboratoires fonctionnent en mode dégradé.

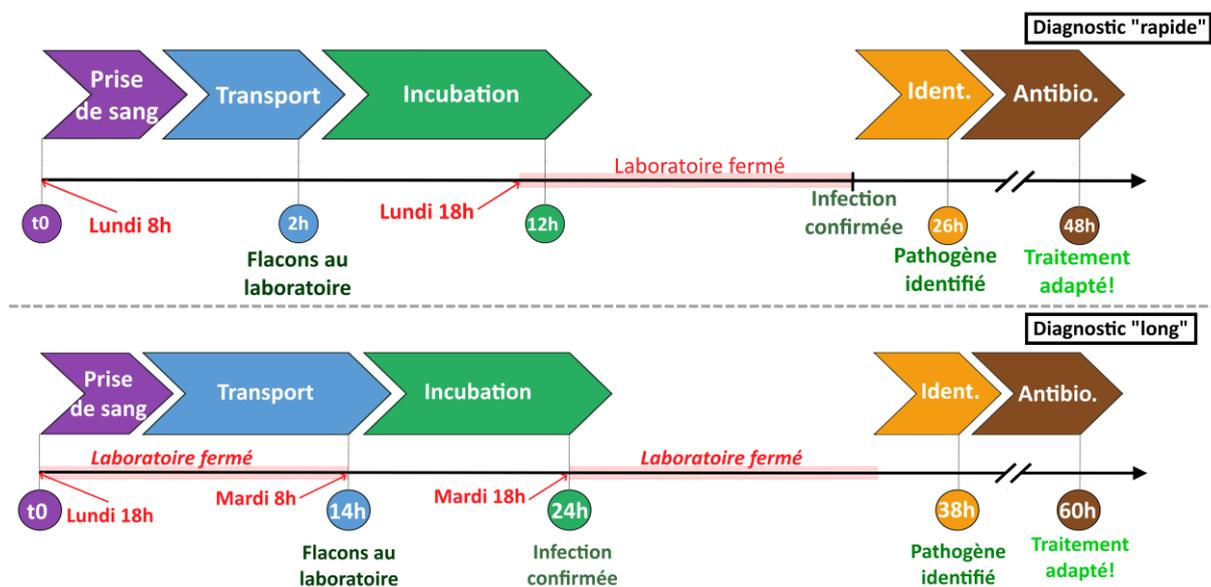


Figure 1-3 : Schémas chronologiques simplifiés du diagnostic d'une bactériémie pour un patient prélevé le matin en semaine et pour un patient prélevé le soir en semaine. Ces deux cas sont supposés avec une identification rapide (en 1 h, sur culot d'hémoculture).

La technologie d'identification choisie permet de gagner de précieuses heures : une analyse MALDI-TOF « classique » nécessitera une culture sur boîte de Petri au préalable (12 à 24 h de croissance en plus), contrairement à l'analyse directement sur culot²⁰ qui peut se faire en moins d'une heure.

De nombreux autres paramètres relevant des bonnes pratiques des personnels de santé sont également étudiés²¹ mais ne seront pas discutés dans ce manuscrit.

1.2. Les différentes méthodes de détection pour le test d'hémoculture

La multiplication des germes dans un milieu de culture produit une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone, métabolite universel des bactéries et levures. La détection d'une hémoculture positive est ainsi basée, le plus souvent, sur une détection d'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone dans le flacon, qu'il s'agisse de la phase liquide ou gazeuse. A l'hôpital, sans détection pendant 5 jours, le flacon est considéré comme négatif.

1.2.1. Les débuts de la détection des infections sanguines

Observer une croissance de germe dans du sang nécessite des conditions particulières. L'utilisation de milieux de culture date du début du XX^{ème} siècle. Heinrich Kayzer a été alors le premier à décrire l'utilisation de bile de bœuf pour cultiver des bacilles typhoïdes²².

En 1906, débute l'utilisation de flacons de verres sous-vides pour le prélèvement du sang de patient²². A cette époque et jusque dans les années 1930, une hémoculture positive était diagnostiquée grâce à l'observation d'une modification de la turbidité du liquide ainsi qu'à son changement de couleur²³.

En 1947, le premier flacon biphasique, produit par bioMérieux, est commercialisé : l'Hémoline™²⁴ (**Figure 1-4 | Gauche**). Il s'agissait d'un flacon rectangulaire avec une surface d'agar sur l'une des parois. Du bouillon de culture est également présent, permettant la culture en phase liquide et l'hydratation de l'agar. La positivité peut donc être détectée par l'augmentation de la turbidité et la présence de colonies sur la surface d'agar.



Figure 1-4 : (Gauche) Flacon biphasique Hémoline™ (bioMérieux) | (Droite) Flacons positif et négatif Signal™ (Oxoid Ltd).

Enfin, en 1986, le flacon Signal™ commercialisé par Oxoid Ltd a été développé²⁵. Il est composé d'un flacon contenant du milieu de culture et d'un autre compartiment situé au-dessus. Les deux compartiments sont reliés, via une aiguille perçant le septum du flacon où la culture est effectuée (**Figure 1-4 | Droite**). La surpression en cas de culture positive engendrera une remontée de liquide contaminé dans le deuxième compartiment. Cette méthode permet d'avoir une détection visuelle et

d'utiliser le deuxième compartiment pour prélever du sang infecté dans le but d'effectuer des analyses complémentaires.

Ces méthodes, bien qu'efficaces pour l'époque, demandaient la présence régulière d'un observateur pour confirmer la détection. Le temps de diagnostic en était fortement impacté. La nécessité d'automatiser le test d'hémoculture conduisit les laboratoires à étudier la détection de métabolites produits par les micro-organismes lors de la culture. Le choix du métabolite s'est porté naturellement sur l'espèce la plus universelle, le dioxyde de carbone.

1.2.2. Les détecteurs automatisés de dioxyde de carbone

Une des premières méthodes utilisées pour la détection de la respiration bactérienne dans le cadre d'un test de stérilité est la respirométrie radiométrique (Bactec™ 460, Becton Dickinson). Breveté en 1972²⁶, son principe consiste à ajouter au milieu de culture des sources de carbone marquées avec l'isotope ¹⁴C. Si des germes sont présents dans l'échantillon, leur croissance engendrera une production de CO₂ radioactif. Grâce à un prélèvement régulier de la phase gazeuse du flacon et à l'analyse de son activité radiologique il était donc possible de confirmer la présence de micro-organismes dans l'échantillon. Chaque prélèvement était accompagné d'un renouvellement d'air « frais » pour pouvoir réitérer la mesure. Cette méthode a été déployée dans la mission spatiale Viking²⁷ afin de pouvoir investiguer la présence de vie sur le sol martien.

Le temps long entre deux mesures, l'instrumentation complexe, la gestion des déchets radioactifs ainsi que la possibilité de contaminations croisées dues au prélèvement de gaz directement dans les flacons contaminés ont été des problèmes certains qui ont encouragé la recherche de nouvelles méthodes de détection. Cependant, la respirométrie radiométrique est très sensible et a encore été utilisée jusque récemment pour la détection de mycobactéries²⁸.

Dans les années 1980, une technologie de mesure par spectrométrie infrarouge fut développée par Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems. La mesure de l'absorption infrarouge du CO₂, entre 2400 cm⁻¹ et 2300 cm⁻¹ (BACTEC™ NR-660 puis le 730 et finalement le 860), permettait une plus grande automatisation du test d'hémoculture²⁹⁻³¹. Bien qu'une quantité légèrement plus importante de faux positifs a été reportée³², la mesure infrarouge conservait les performances du BACTEC 460, sans avoir à utiliser de composants radioactifs. Ce système était donc économique et plus viable pour les laboratoires³³. En revanche, la nécessité de prélever le gaz contenu à l'intérieur du flacon ne résolvait pas le problème des contaminations croisées. Cette barrière technologique fut surmontée avec

l'automate BioArgos (Sanofi Diagnostics Pasteur) qui permettait une mesure infrarouge à travers le flacon³⁴. Malheureusement, le verre de haute qualité nécessaire pour une telle mesure³⁵ a rendu cette invention trop coûteuse pour un déploiement à grande échelle.

Au début des années 1990, l'utilisation des optodes devint la nouvelle norme. Ces capteurs à transduction optique^{36,37}, colorimétrie ou fluorescence, permettent le suivi d'un échantillon de fluide séparé des transducteurs par une membrane à perméabilité sélective. Ce fut le cas pour l'automate VITAL vendu par bioMérieux³⁸.

Le principe est le même quel que soit l'automate : un polymère, saturé en eau, possédant un indicateur de pH et perméable au dioxyde de carbone, est placé au fond du flacon d'hémoculture. Lorsque du CO₂ est produit par la croissance de micro-organismes, il diffuse à travers ce polymère. Par hydratation, de l'acide carbonique est créé, abaissant le pH de la solution et conduisant à la modification du polymère.

Les automates de Becton Dickinson (BACTEC™ série 9000 puis FX)^{39,40} utilisent l'apparition d'une fluorescence de ce polymère, tandis que les automates de bioMérieux (BACT/ALERT®)⁴¹ utilisent une détection colorimétrique (**Figure 1-5**).

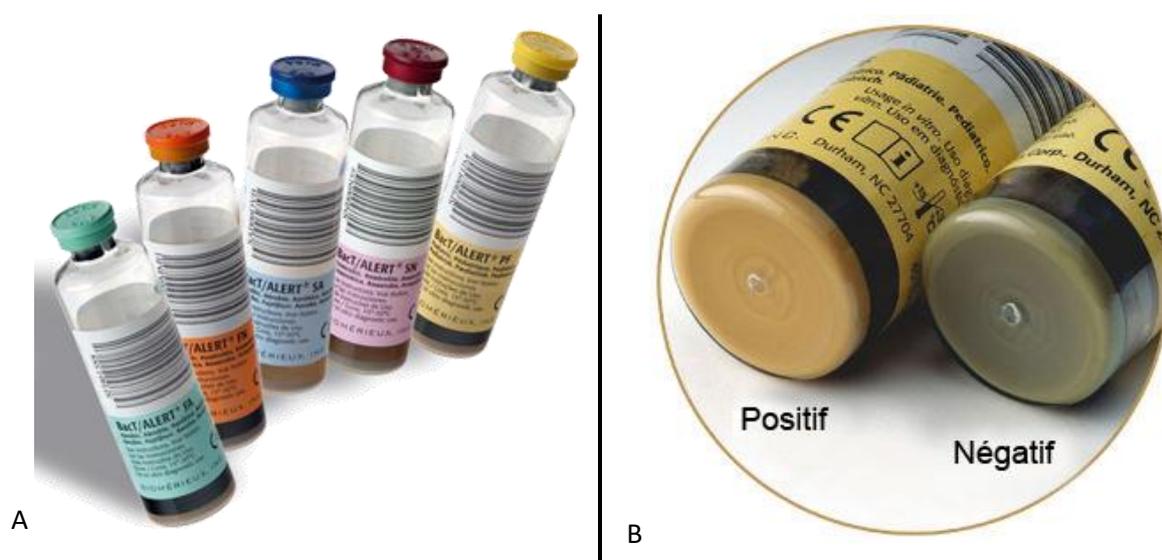


Figure 1-5 : (Gauche) Gamme des flacons BACT/ALERT® | (Droite) Variation de couleur entre des flacons BACT/ALERT® positifs et négatifs⁴².

Il existe enfin un autre type d'automate, mais dont la transduction est barométrique. Commercialisés par Thermo Scientific™, les flacons Versatrek™ sont munis d'un opercule qui se gonfle légèrement à cause de la surpression induite par la croissance bactérienne⁴³. Une mesure optique permet de détecter ce gonflement et d'en conclure la positivité de la culture.

Les équipements, très complets et automatisés, utilisés aujourd'hui permettent le chargement de plusieurs flacons (jusqu'à plusieurs centaines), leur culture (à 36°C sous agitation permanente) et la détection par méthode optique de la positivité.

En une cinquantaine d'années, l'automatisation des hémocultures a permis une diminution importante des temps de réponse, caractéristique toutefois tributaire de la concentration bactérienne dans le sang du patient (entre 0,1 cfu/mL et 10 cfu/mL¹).

A titre d'exemple, pour un même groupe bactérien (ici les *cocci* à Gram positif), les derniers automates détectent en moyenne deux fois plus vite que la première technologie de respirométrie radiométrique :

- Respirométrie radiométrique (BACTEC 460)³¹ : 30,2 h ;
- Première génération des automates « infra-rouge » (BACTEC NR-660)³¹ : 29,6 h ;
- Dernière génération des automates « colorimétrique » (BACT/ALERT Virtuo)⁴⁴ : 15,9 h.

1.2.3. Les automates utilisant l'électrochimie

En 1899, G. N. Stewart rapporte l'intérêt de la mesure de conductivité entre deux électrodes de platine, dans des milieux biologiques, pour détecter une croissance bactérienne⁴⁵. Depuis, quelques automates utilisant des principes électrochimiques pour la détection d'une croissance de micro-organismes ont été développés par différentes sociétés.

La nécessité pour une méthode électrochimique d'avoir une reprise de contact (c'est-à-dire des fils électriques entre les électrodes et l'appareil de mesure) n'est que peu compatible avec l'impératif de stérilité du flacon d'hémoculture ainsi qu'avec son caractère jetable. De plus, une mesure d'impédance ou de conductivité ne peut être effectuée que dans un milieu dont cette caractéristique change significativement avec la croissance de micro-organismes.

Quatre systèmes commerciaux sont basés sur une mesure de conductivité ou d'impédance au cours du temps, entre deux électrodes métalliques (généralement en platine ou en acier inoxydable)⁴⁶.

Le Bactometer (bioMérieux) ainsi que le BacTrac (Sy-Lab) permettent une détection de bactéries, directement dans un milieu de culture, en mesurant une variation d'impédance⁴⁷⁻⁴⁹.

Le Malthus (Malthus Instruments) et le RABIT (Don Whitley Scientific), pour *Rapid Automated Bacterial Impedance Technique*, sont des systèmes basés uniquement sur mesure de conductivité du milieu de culture au cours du temps⁵⁰⁻⁵⁴. Pour des micro-organismes où la mesure directement dans le milieu de culture n'est pas possible, les électrodes sont délocalisées dans une solution de mesure. La culture se fait dans un compartiment séparé, le dioxyde de carbone (gazeux) formé par la croissance bactérienne

modifie la conductivité de ce milieu de mesure. Le principe de fonctionnement de ces méthodes est représenté en **Figure 1-6**.

Malgré leurs performances, ces automates ne sont pas utilisés en hémoculture. En effet, une variation d'impédance (ou de conductivité) nécessite de maîtriser le milieu de mesure pour optimiser la sensibilité de détection : une concentration trop importante ou trop faible en sels se traduira par des signaux difficilement analysables et une détection d'autant plus complexe⁵⁵. De plus, la mesure indirecte du Malthus ou du RABIT est plus coûteuse (en termes d'instrumentation) qu'un « simple » flacon BACTEC™ ou BACT/ALERT®.

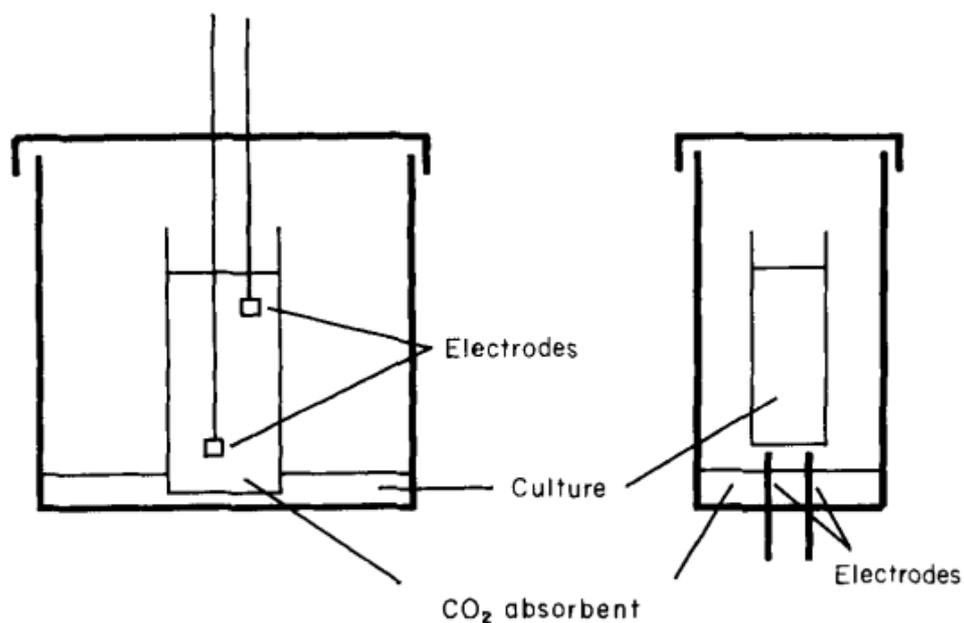


Figure 1-6 : Mesure indirecte de la conductivité pendant la culture⁵¹. (Gauche) Système Malthus | (Droite) Système RABIT.

1.3. L'identification bactérienne

Afin d'adapter correctement l'antibiothérapie d'un patient, l'identification du pathogène est primordiale. Cette identification est effectuée habituellement après augmentation de la biomasse, donc après la culture. Cependant quelques méthodes semblent pouvoir bouleverser cette chronologie.

1.3.1. Identification après culture

1.3.1.1. Méthodes métaboliques

En choisissant un substrat particulier, il est possible d'identifier un micro-organisme suivant la réaction qu'il produira. Ce substrat peut être liquide ou solide.

Les galeries API (pour « *Analytical Profile Index* ») sont composées de plusieurs tubes, remplis de réactifs lyophilisés. Une suspension mono-microbienne (bactérienne ou fongique) non identifiée est inoculée dans chacun des tubes, qui sont ensuite mis en culture pendant 18 à 24 h. La couleur de chaque tube indique, grâce à la notice du fabricant, si le test est positif ou négatif. On aura ainsi une information sur l'activité enzymatique de la bactérie à identifier.

Une galerie couvre en moyenne 20 activités métaboliques (**Figure 1-7 | Gauche**), chacune ayant une réponse binaire. En combinant les données de plusieurs galeries API, il est possible d'identifier 700 espèces de bactéries et de levures différentes grâce à la base de données APIweb™.

Il s'agit tout de même d'une identification avec *a priori* puisqu'il est nécessaire de choisir les galeries pertinentes pour le pathogène à identifier : *e.g.* API 20E pour les entérobactéries, API Staph pour les staphylocoques, API NE pour les bacilles à Gram négatif non entérobactéries non fastidieux, *etc.* C'est pourquoi une identification par le biais de ces tests biochimiques requiert toujours préalablement des tests d'orientation.

D'autres tests de ce type sont commercialisés, l'Enterotube™ II de Becton Dickinson ou encore le Micro-ID de Thermo Scientific™, mais ils possèdent tous les mêmes limites : le besoin d'un opérateur pour préparer l'échantillon, le temps long pour obtenir une réponse et une fiabilité critiquable⁵⁶. Les conditions de préculture de l'échantillon peuvent en effet modifier la signature d'une galerie API pour une même souche.



Figure 1-7 : (Gauche) Exemple de galerie API (https://fr.wikipedia.org/wiki/Galerie_API) | (Droite) Boite CHROMID® permettant de détecter les bactéries à Gram négatif résistantes à la colistine (<http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/119-chromid-colistin-r>)

L'utilisation de boîtes de Petri chromogéniques, telles que les CHROMID® de bioMérieux (**Figure 1-7 | Droite**) ou les CHROMagar™ de l'entreprise du même nom, sont également souvent utilisées en

microbiologie clinique. Il s'agit d'un milieu contenant un substrat chromogène : sa dégradation par une voie enzymatique particulière (*e.g.* β -glucuronidase, α -glucosidase, C8-esterase, *etc.*) entrainera sa coloration. Il est ainsi possible d'identifier une bactérie ou un mécanisme d'antibiorésistance. Néanmoins, cette méthode nécessite une incubation d'au moins 16 h et l'emploi d'une seule activité enzymatique ne permet pas toujours l'identification à l'espèce de manière fiable. Cette méthode ne peut donc être la seule employée.

1.3.1.2. Spectrométrie de masse

L'utilisation d'un MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight Mass Spectrometry*) est devenue courante dans les laboratoires hospitaliers^{57,58} et dans les laboratoires privés. Son principe, présenté en **Figure 1-8**Figure, est basé sur l'analyse du protéome (ensemble des protéines) de la bactérie.

Pour cela, après une hémoculture positive, le micro-organisme est isolé puis cultivé sur boîte de Petri afin d'augmenter sa biomasse et de séparer éventuellement les espèces. Ensuite, les bactéries sont mises en suspension puis mêlées à des réactifs facilitant l'ionisation et la fragmentation. Une goutte du mélange résultant est déposée sur un substrat métallique pour une évaporation complète du solvant.

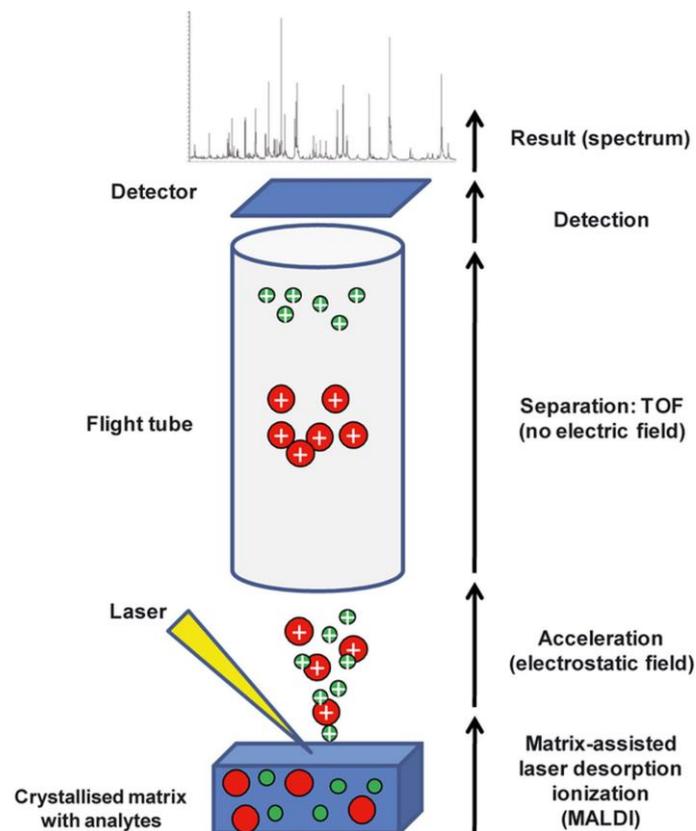


Figure 1-8 : Principe de la spectrométrie MALDI-TOF par Croxatto *et al.*⁵⁹.

Un laser UV à 337 nm vient cibler ce dépôt, ce qui permet de désorber, fragmenter et ioniser une partie des protéines les plus légères (protéines ribosomales principalement). Les ions ainsi générés sont accélérés via un champ électrique dans le spectromètre.

Les molécules chargées vont ainsi se déplacer jusqu'à un détecteur. Leur temps de vol, dépendant de leur masse et de leur charge, permet de tracer un spectre qui sera comparé à des bases de données. Cette méthode est donc sans *a priori* puisque la préparation de l'échantillon et le protocole d'acquisition de spectres sont identiques pour toutes les espèces, mais avec *a priori* puisque qu'il est nécessaire d'avoir déjà observé la bactérie recherchée afin que sa signature soit présente dans la base de données

Afin de gagner plusieurs heures dans l'étape d'identification, l'entreprise Bruker a commercialisé le kit Sepsityper^{®60}. Grâce à une préparation manuelle du culot provenant de l'hémoculture positive, il permet, en moins d'une heure, d'effectuer une spectrométrie de masse en s'affranchissant de la préculture sur boîte de Petri. Cette méthode semble cependant plus particulièrement adaptée aux bactéries à Gram négatif.

Les modèles VITEK^{®MS} (bioMérieux), Axcress[®] (Accugenix[®]) et MALDI Biotyper[®] (Bruker) dominent le marché actuellement, bien que le coût d'un tel automate soit élevé (≈150 k€).

1.3.1.3. Méthodes génomiques

L'utilisation de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se développe de plus en plus malgré un coût encore important. Ce procédé permet d'augmenter la quantité d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ou ARN (Acide RiboNucléique) présent dans un échantillon. Après cette étape d'amplification, sélective, une électrophorèse est utilisée pour identifier la séquence nucléique visée⁶¹.

L'utilisation de ces kits PCR est conditionnée à une identification ciblée (avec choix des amorces) et un coût en réactifs important. Cependant, malgré la nécessité d'une préculture pour obtenir une concentration bactérienne suffisante (entre 10 et 10⁵ cfu/mL suivant les espèces⁶²), cette méthode permet un gain de temps important sur l'identification.

Plusieurs kits sont commercialisés et certains automates de PCR multiplex ont fait leur apparition depuis quelques années. Le Biofire FilmArray[®] de bioMérieux permet ainsi, grâce au panel BCID2, de détecter jusqu'à 43 cibles différentes, couvrant 95 % des pathogènes responsables de bactériémies⁶³ mais également certains gènes de résistances aux antibiotiques⁶⁴. Ce type d'équipement permet une analyse simultanée de plusieurs types de micro-organismes, avec des amorces ciblant les agents infectieux les plus courants et dangereux.

1.3.1.4. Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques se basent sur la reconnaissance de la liaison d'un anticorps avec un antigène. Cet antigène peut être issu de la réponse immunitaire ou simplement de la bactérie détectée et isolée depuis une hémoculture⁶⁵ (Willey *et al.*, Prescott – *Microbiology*, p.875). La liaison anticorps-antigène peut être détectée de plusieurs manières comme l'agglutination par exemple, présentée en **Figure 1-9 | Gauche**.

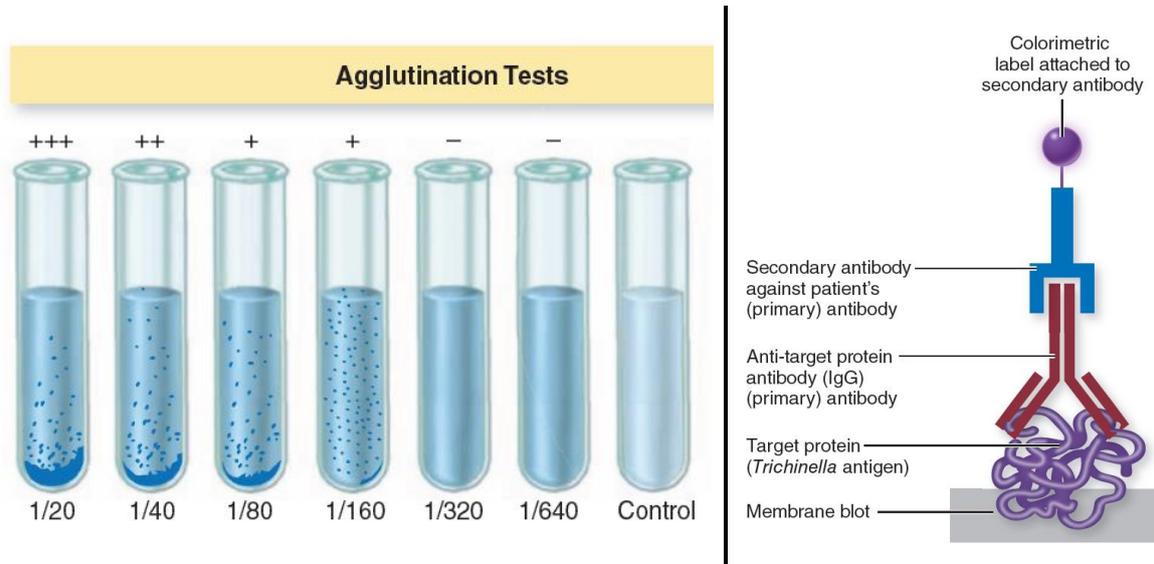


Figure 1-9 : Deux types de tests immunologiques⁶¹. (Gauche) Test par agglutination. Le même nombre d'antigènes est ajouté à chaque tube, et le sérum du patient est dilué en série. Le titre dans ce cas correspond à la dernière dilution permettant une agglutination (ici 1/160). | (Droite) Test Western blot de *Trichinella* (parasite). La liaison de l'anticorps secondaire avec l'anticorps primaire est détectée par colorimétrie.

De nombreux tests immunologiques permettant une automatisation, au moins partielle, existent, tels que l'ELISA ou encore le Western blot⁶¹.

Ce dernier nécessite la lyse des bactéries isolées afin d'obtenir un ensemble de protéines, qui seront séparées suivant leur poids moléculaire par électrophorèse. Les membranes obtenues sont ensuite incubées dans des solutions d'anticorps (primaires) spécifiques aux protéines recherchées (permettant l'identification). Enfin, des anticorps secondaires, spécifiques aux anticorps primaires et marqués avec des composés radioactifs, fluorescents ou luminescents, sont ajoutés. La liaison de l'anticorps secondaire engendrera un changement (une lumière émise par exemple) qui indiquera la présence d'un anticorps primaire et donc de la protéine recherchée. Le principe de ce procédé est représenté en **Figure 1-9 | Droite**.

Ce type de méthode est malheureusement coûteux du fait de l'utilisation de nombreux anticorps. Elle demande également un personnel qualifié pour l'utilisation de kit tels que le BD OptEIA™ (BD Biosciences) bien que des automates, comme le VIDAS® (bioMérieux), limitent ce problème. Enfin, en

cas de mutation importante de la protéine à détecter, cette méthode ne sera pas utilisable. Elle est donc avec *a priori* et peu robuste.

1.3.2. Identification pendant la culture

Peu d'automates d'hémoculture ont proposé une identification en parallèle de la détection. On parle d'ailleurs plus aisément d'orientation.

En 1994, un brevet⁶⁶ a été déposé concernant l'utilisation de la spectrométrie à mobilité ionique (IMS) pour un test de stérilité. Par l'ionisation des molécules de gaz produites par les micro-organismes, il est possible de déterminer le coefficient de mobilité ionique de chaque molécule. L'enjeu de cette technologie réside donc dans la détection d'un COV (composé organique volatile), sécrété spécifiquement par un micro-organisme en train de croître dans l'échantillon.

En phase gaz, l'utilisation d'un CSA (*Colorimetric Sensor Array*), nez artificiel à transduction colorimétrique, inséré dans des boîtes de Petri⁶⁷⁻⁶⁹ puis directement dans le bouchon du flacon d'hémoculture⁷⁰ (**Figure 1-10**), est une technologie proche (dans sa philosophie) de la méthode développée pendant ce doctorat.

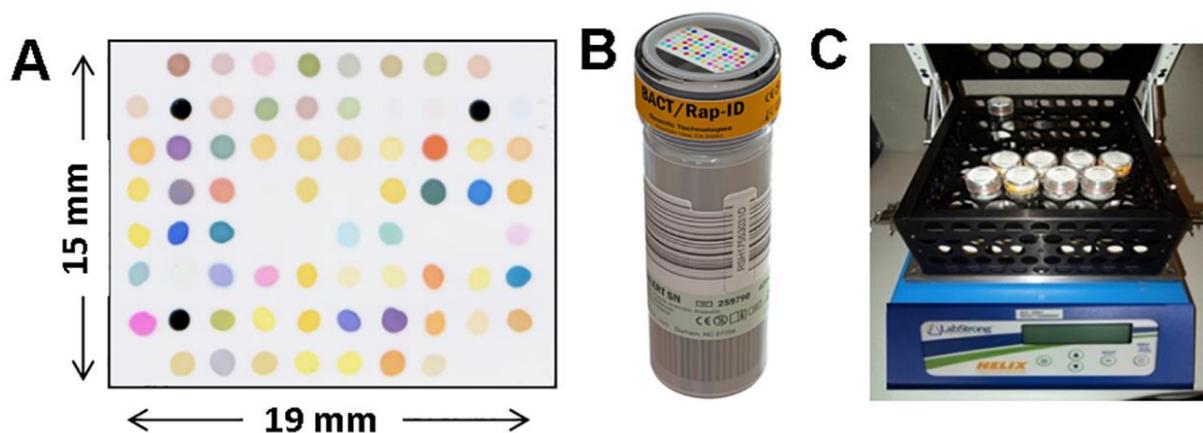


Figure 1-10 : (Gauche) Matrice du *Colorimetric Sensor Array* | (Centre) Instrumentation d'un bouchon de flacon d'hémoculture | (Droite) Prototype d'automate utilisant le système du CSA⁷⁰.

Son principe repose sur une matrice de capteurs où sont déposés des sondes spécifiques à certaines molécules, potentiellement présentes dans la phase gaz du flacon. La liaison sonde-cible engendre un changement de couleur du capteur associé. L'évolution des changements de couleur est monitorée par un scanner. Grâce aux différents motifs enregistrés sur la matrice, Shrestha *et al.* ont pu établir des « cartes d'identification » des espèces bactériennes et fongiques en culture⁷⁰. Non seulement les changements de couleur permettent une détection mais une identification semble possible (dans la limite des 7 espèces testées) pendant la culture, sans ouvrir le flacon.

En phase liquide, l'équipe de recherche de Yoann Roupioz au CEA de Grenoble utilise des réseaux d'anticorps sur un prisme de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) au contact de l'hémoculture⁷¹. Les résultats obtenus permettent d'envisager une utilisation de cette méthode avec des sondes peu spécifiques. Tout comme pour le CSA, une suffisamment grande diversité de sondes semble permettre de détecter une croissance bactérienne puis d'identifier le pathogène présent via des « cartes d'identification » spécifiques, en parallèle et sans perturber la culture.

L'utilisation d'une telle méthode en milieu clinique n'est pas encore envisageable pour le moment mais les résultats sont très prometteurs. La méthode de SPR est schématisée en **Figure 1-11**.

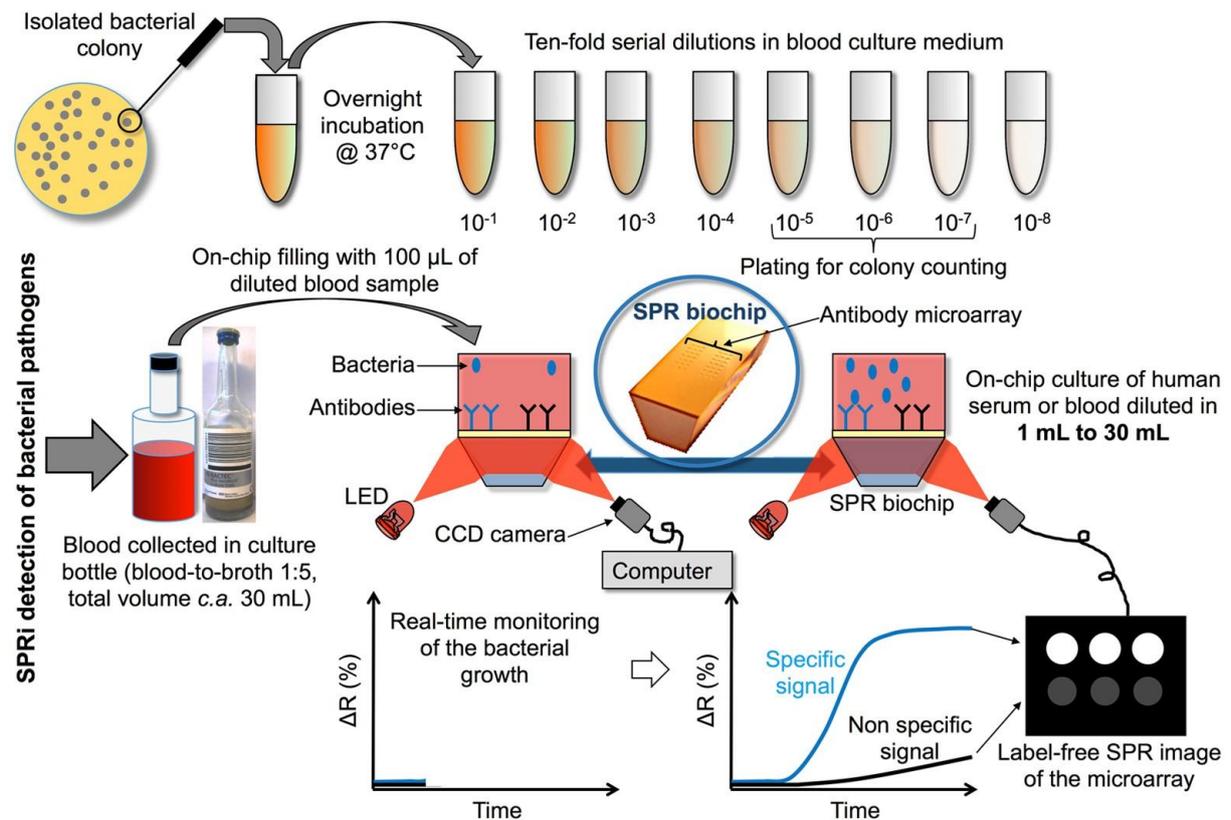


Figure 1-11 : Principe de l'utilisation de la résonance plasmonique de surface (SPR) pour la détection de bactéries. Un réseau d'anticorps est immobilisé sur un prisme SPR, mis en contact avec une hémoculture positive. La lumière incidente illumine le prisme et la lumière réfléchiée est enregistrée. Le couplage anticorps-bactéries engendrera un signal spécifique détectable. Le choix d'une matrice d'anticorps adaptée permettra une détection multiparamétrique et donc une identification⁷¹.

1.3.3. Les technologies de rupture

Le temps pour le diagnostic d'une infection sanguine est une donnée critique directement liée au taux de survie du patient. Certaines entreprises, dans un souci de gain de temps, mettent sur le marché

des dispositifs qui, potentiellement, permettent de détecter les micro-organismes présents dans un échantillon de sang directement prélevé sur le patient, sans aucune culture, par PCR. Le gain de temps, relatif à l'absence d'incubation, est contrebalancé par des limites relativement importantes :

- **Détection avec *a priori*.** Cette approche nécessite des amorces spécifiques aux micro-organismes recherchés.
- **Détection destructive.** La lyse des cellules est obligatoire, l'échantillon sanguin n'est plus utilisable pour des analyses complémentaires, comme un antibiogramme par exemple.
- **Faux négatifs.** Les pourcentages de détection sont faibles (75 à 50 %) car directement reliés à la quantité de biomasse faible présente dans l'échantillon. La concentration bactérienne dans un sang infecté étant de l'ordre de 1 cfu/mL, un volume de plusieurs millilitres est nécessaire pour améliorer les performances⁷².
- **Positifs non-confirmés.** Certains tests PCR reviennent positifs alors même que l'hémoculture associée est négative. Ce résultat étonnant pourrait être causé par la présence d'ADN de bactéries mortes, dans le sang du patient⁶³.

Malgré ces limites, la société T2 Biosystem® a développé récemment une méthode permettant de s'affranchir de l'utilisation d'un marqueur fluorescent, et ainsi de travailler avec des échantillons de sang dans lesquels la concentration bactérienne est de l'ordre de 1 cfu/mL.

Des sondes sont liées (par liaisons covalentes) à des nanoparticules super-paramagnétiques. Chaque cible (espèce bactérienne recherchée) est associée à deux sondes donc deux couples sondes-particules⁷³.

En présence de brins d'ADN complémentaires à la cible (obtenus après lyse et PCR sur un échantillon sanguin) les nanoparticules s'agglutinent par hybridation (**Figure 1-12**). Par résonance magnétique, le changement du temps de relaxation T2, associé à ce regroupement, est détectable⁷⁴⁻⁷⁶.

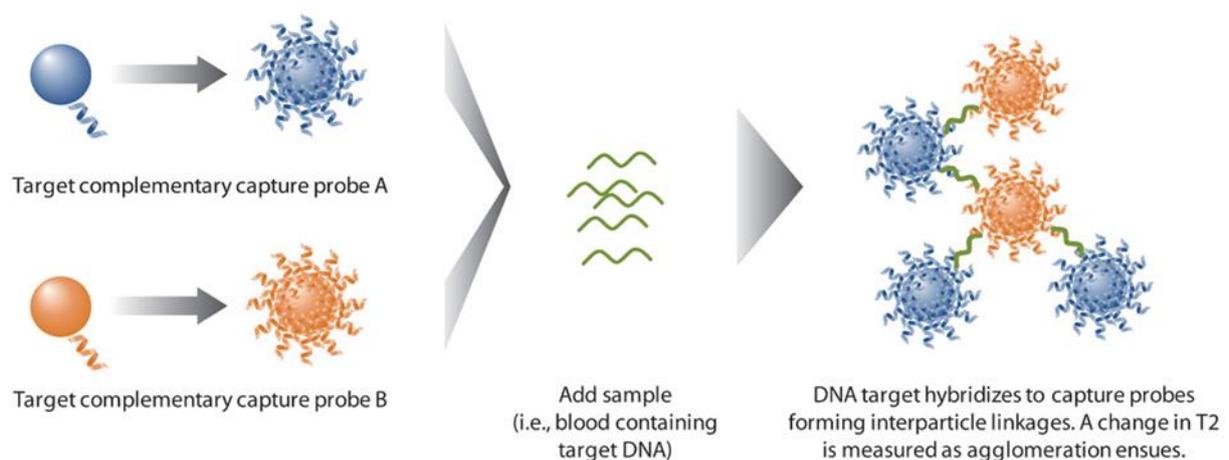


Figure 1-12 : Principe de détection par résonance magnétique proposée par le système T2MR^{®73}.

Bien que ces automates ne comportent pour l'instant qu'un panel réduit de sondes, le gain de temps très conséquent (résultats en quelques heures au lieu de quelques jours) et la précision de cette méthode semblent intéresser grandement les praticiens hospitaliers.

Le **Tableau 1-1** résume les principales méthodes de détection et d'identification adaptées à l'hémoculture présentées dans cette première partie du chapitre introductif.

On comprend ainsi aisément pourquoi une détection, du CO₂, produit par mesure optique automatisée assistée par une analyse MALDI-TOF (*a posteriori*) est le procédé privilégié dans les hôpitaux des pays riches. Les méthodes lentes et coûteuses en main d'œuvre sont logiquement celles utilisées dans les pays aux ressources limitées (LRS, *Low-Resource Settings*).

Malheureusement, ce sont ces pays où les enjeux d'antibiorésistances sont les plus importants. Il serait donc extrêmement pertinent de développer des outils de diagnostic peu coûteux et portables permettant la détection et l'identification, tout en réduisant le temps de réponse associé.

Certaines techniques électrochimiques sont particulièrement adaptées à la détection et l'identification de molécules présentes en solution. L'utilisation de ce type de capteurs en microbiologie est donc naturellement étudiée, depuis plusieurs années, au Département des micro-Technologies pour la Biologie et la Santé (DTBS) du CEA Grenoble^{77,78}.

Tableau 1-1 : Récapitulatif des forces et faiblesses des technologies de détection et d'identification bactérienne adaptées aux hémocultures.

	Méthodes existantes	Rapidité du test [†]	Encombrement		Temps technicien (par test)	Coûts approximatifs	
			Poids	Volume		Par test	De l'équipement
Détection	Flacon biphasique ⁷⁹	Lent	< 1 kg	Un incubateur	Détection visuelle	10 €	
	Flacon Signal ^{TM80}	Lent	< 1 kg			20 €	
	Respirométrie radiométrique ⁸¹	Lent	NA		< 1 min	1 - 3 €	20 - 30 k€
	Automates optiques de dernière génération ⁸²	Rapide	> 200 kg	> 2 m ³	< 1 min	1 - 5 €	150 k€ [‡]
	Impédance ou conductimétrie ^{81,83}	NA	20 - 50 kg	0,1 m ³	< 1 min	1 - 3 €	10 - 15 k€
Identification	Galerie API	Lent	< 1 kg	Une galerie	1 min	10 - 20 €	
	Boite agar ChromID [®]	Lent	< 1 kg	Une boîte de Petri	1 min	3 - 4 €	
	PCR multiplexe ⁸⁴⁻⁸⁷	Rapide	10 - 30 kg	0,1 à 1 m ³	2 - 5 min	30 - 200 €	40 k€
	MALDI-TOF ⁸⁸	Rapide	> 100 kg	0,5 m ³	10 - 20 min	1 - 5 €	150 k€ [‡]
	Sepsityper ^{®89}	Rapide			10 min	10 €	
	ELISA, Western blot ^{90...}	Lent	NA		NA	1 - 15 €	NA
Les 2	Résonance plasmonique de surface ⁷¹	En continu	NA		NA		
	Colorimetric Sensor Array ⁷⁰	En continu	NA		< 1 min		
	T2 MR ^{®91,92}	Rapide	> 100 kg	0,5 m ³	< 5 min	150 €	140 k€

NOTE : les données ont été estimées soit via le système de commande du CEA, soit par des recherches plus approfondies (cf. Références). Les coûts affichés étant un ordre de grandeur, les valeurs n'ont pas été corrigées par l'inflation pour les technologies datées.

[†] Basée sur l'ensemble des données bibliographiques données dans ce chapitre.

[‡] Information provenant d'une communication personnelle d'un professionnel de santé.

2. Apport de l'électrochimie pour la détection et l'identification bactérienne

Les méthodes de détection et/ou d'identification de micro-organismes par électrochimie peuvent être séparées en trois grandes stratégies :

- La détection et l'identification de certains métabolites bactériens ou fongiques possédant des potentiels d'oxydation ou de réduction particuliers ;
- L'utilisation de sondes permettant la capture sélective d'un microbe à une électrode entraînant la modification d'une caractéristique électrochimique détectable ;
- Les méthodes annexes, se voulant *label free* donc sans sonde ou biomarqueur spécifique.

La majorité de ces méthodes se concentre sur la problématique de la détection et non sur celle du diagnostic clinique : les milieux de mesure doivent être maîtrisés en terme de composition ionique alors que les liquides physiologiques présentent des grandes variabilités inter et intra-individuelles.

2.1. Détection de métabolites bactériens

L'électrochimie étant la science du couplage entre réactions chimiques et passage de courant électrique, une méthode pratique pour la détection de micro-organismes est l'analyse de métabolites ayant un comportement oxydant (ou réducteur) reconnaissable.

Il est également possible de détecter un micro-organisme en ciblant certaines de ses activités enzymatiques afin de produire une molécule facilement identifiable.

On peut donc distinguer deux formes de mesures : la mesure directe, où une molécule particulière est recherchée, et la mesure indirecte, utilisant une réaction chimique révélant la présence du micro-organisme.

2.1.1. Mesure directe

Malgré le grand nombre de molécules excrétées par une bactérie lors de sa croissance, très peu sont utilisées pour de la détection électrochimique. Le bacille à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* est quasiment le seul micro-organisme détecté de manière directe. Son intérêt clinique est très important car cette bactérie fait partie du groupe *ESKAPE*, six bactéries présentant des résistances multiples aux antibiotiques⁹³.

Parmi la grande variété de molécules composant le *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* (l'ensemble des molécules sécrétées par la bactérie et participant à la communication bactérienne)

seules quelques-unes possèdent une activité oxydo-réductrice et sont donc utilisées pour sa détection électrochimique.

La pyocyanine (notée PYO), est une espèce redox acido-basique étudiée depuis les années 1930 en électrochimie⁹⁴. Son caractère sidérophore, c'est-à-dire sa capacité à se lier à des complexes ferriques permettant ainsi la libération d'ions Fe^{2+} , en fait une molécule essentielle pour certains micro-organismes, comme pour *P. aeruginosa*⁹⁵.

Son système redox étant connu, de nombreuses équipes de recherche travaillent à créer des capteurs toujours plus sensibles et performants, en utilisant des méthodes électrochimiques telles que la voltampérométrie cyclique^{96,97}, l'ampérométrie⁹⁸ ou la voltampérométrie à signaux carrés de potentiel⁹⁹⁻¹⁰⁴.

Dans une moindre mesure, le 2-heptyl-4(1H)-quinolone (noté HHQ) et la Pseudomonas quinolone signal (notée PQS) sont également étudiées par ces mêmes méthodes électrochimiques.

Les formules chimiques de ces 3 molécules sont visibles en **Figure 1-13**.

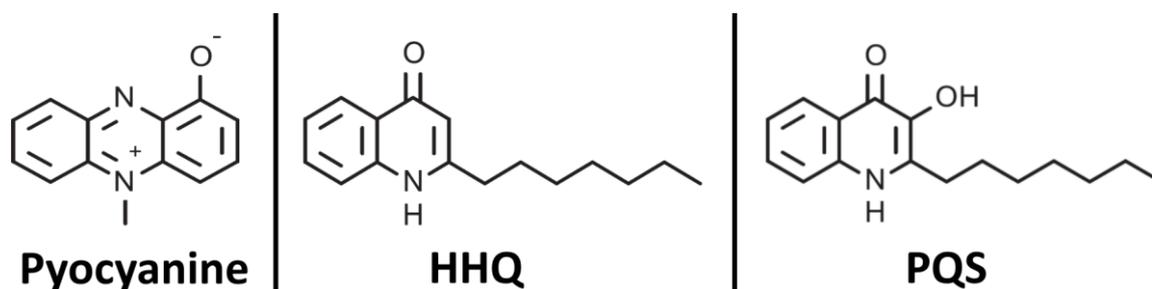


Figure 1-13 : Formule développée de la pyocyanine, du 2-heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ) et de la Pseudomonas quinolone signal (PQS).

L'analyse électrochimique du *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* (dans le surnageant) a notamment fait l'objet d'une thèse⁷⁷, effectuée par Julie Oziat au DTBS du CEA Grenoble. En analysant les pics d'oxydation ou de réduction des espèces présentes dans le milieu, il est possible d'obtenir une empreinte électrochimique des métabolites. Ce profil particulier pourra servir par la suite à identifier la bactérie dans un échantillon à analyser. Les pics observés en SWV (*Square Wave Voltametry*) dans le surnageant de *Pseudomonas aeruginosa* sont présentés en **Figure 1-14**.

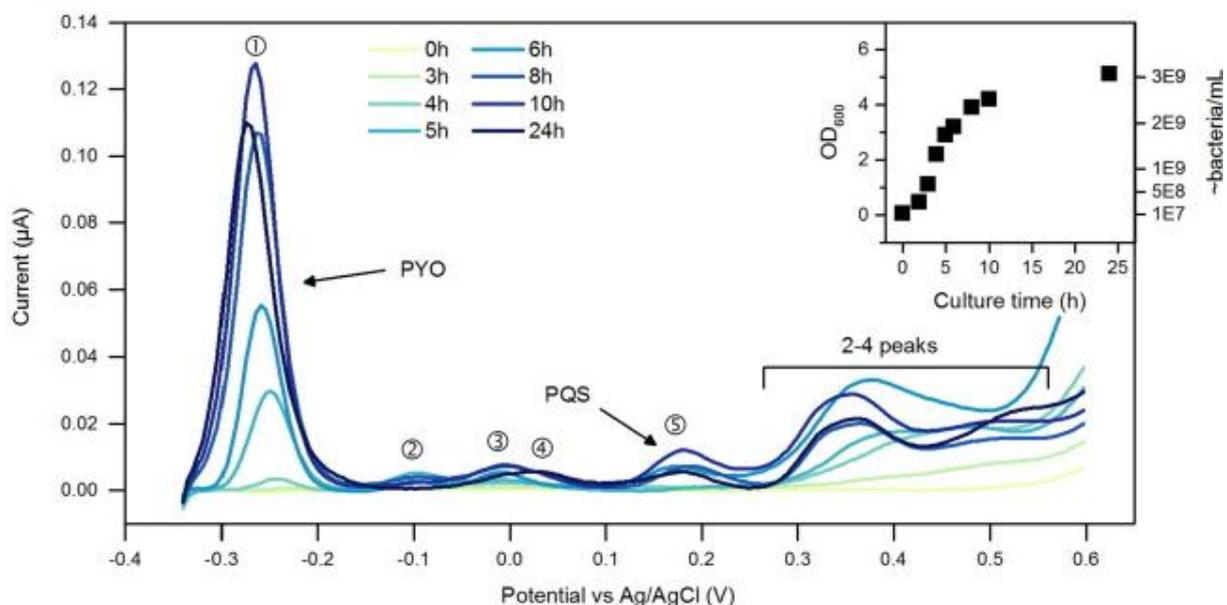


Figure 1-14 : Evolution temporelle des SWV sur une électrode de carbone vitreux dans le surnageant d'une culture de *P. aeruginosa*⁹⁹. On observe le pic caractéristique de la pyocyanine (PYO) et d'autres pics correspondant à d'autres molécules du *quorum sensing*.

Cette méthode est néanmoins limitée. Elle ne fonctionne que pour des bactéries sécrétant des molécules bien particulières, identifiables électrochimiquement et en quantité suffisante. De plus, si d'autres molécules en solution possèdent des potentiels d'oxydoréduction proches du ou des pics recherchés, l'identification sera biaisée.

2.1.2. Mesure indirecte

Afin de pallier certaines limites de la mesure directe, des voies métaboliques microbiennes spécifiques peuvent être mises à profit pour générer des produits aisément détectables.

Par exemples, des sucrases spécifiques peuvent être ciblées, telles que la β -D-glucuronidase ou la β -D-galactosidase. En présence de certains substrats ajoutés à la solution de culture, l'enzyme ciblée produira une molécule identifiable électrochimiquement^{105,106}.

Il est également possible d'utiliser un bactériophage pour lyser les bactéries et libérer les enzymes, ce qui augmente significativement la sensibilité de détection¹⁰⁷, car on a alors accès à la fois aux métabolites extra- et intracellulaires. Bien que les limites de détection obtenues expérimentalement se situent autour de 10^2 cfu/mL, une valeur très intéressante, ce n'est pas une méthode applicable à l'hémoculture.

D'autres procédés de mesure indirecte sont également possibles, en utilisant des réactions de biocatalyses effectuées par la bactérie recherchée par exemple. Sun *et al.* décrivent l'utilisation d'un médiateur redox, la p-benzoquinone, qui sera réduit par la respiration bactérienne¹⁰⁸ (Figure 1-15).

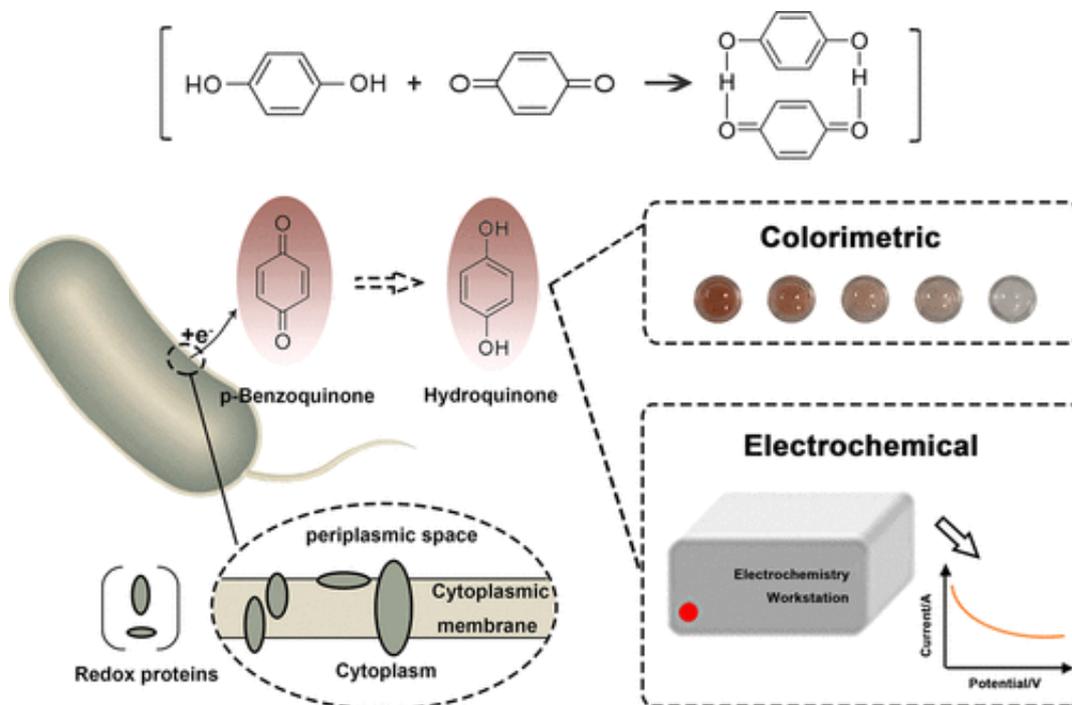


Figure 1-15 : Schéma représentant la méthode utilisée par Sun *et al.*¹⁰⁸ afin de détecter *E. coli*. En présence de la bactérie, la p-benzoquinone se réduit en hydroquinone, qui réagit avec la p-benzoquinone restante pour former un complexe rouge (quinhydrone).

Une détection électrochimique et colorimétrique est donc envisageable mais avec des limites de détection moins intéressantes que les précédentes études citées (entre 10^3 et 10^4 cfu/mL). L'électrolyte est également artificiel, un tampon phosphate salin est nécessaire pour s'assurer de la qualité de la mesure.

Enfin, l'utilisation de sondes à base d'anticorps spécifiques à des molécules d'intérêt, telle que la protéine C réactive¹⁰⁹ (CRP, biomarqueur d'une inflammation, possiblement due à une infection), a également été envisagée.

Ces types de procédés restent complexes et non adaptés à la réalité hospitalière bien qu'offrant souvent l'avantage d'être quantitatifs en termes de biomasse microbienne présente en solution. Les électrolytes utilisés sont généralement « simples » voire artificiels (eau, PBS, milieu de culture LB, tampon acétate...). Enfin, la recherche de molécules spécifiques exige nécessairement une détection avec *a priori*.

2.2. Fixation d'un micro-organisme sur une sonde

Un procédé largement répandu et étudié pour détecter la présence d'un micro-organisme dans un échantillon liquide est l'utilisation d'une sonde spécifique à une cible. La sonde est fixée sur une électrode, l'association par reconnaissance biomoléculaire entre la sonde et la cible est détectable via une mesure électrochimique.

Il existe plusieurs types de sondes. Les plus utilisées sont les anticorps, les sondes ADN ou ARN (pour des liaisons avec des aptamères pour une détection type antigène/anticorps de la bactérie entière ou une hybridation dans le cadre d'une détection par génotypage) et les bactériophages.

2.2.1. Utilisation d'un anticorps

Un anticorps est une protéine capable de reconnaître et de se lier à une molécule ou macromolécule cible, appelée antigène, de manière très spécifique. Cette haute spécificité permet d'utiliser les anticorps, préalablement fixés à une électrode, en tant que sonde. Un anticorps donné pourra se fixer à un antigène présent sur la membrane d'un ensemble de souches appelé sérovar. Ainsi, en rassemblant plusieurs anticorps, et donc plusieurs sérovares, il peut être possible de couvrir la majorité des souches d'une espèce.

La détection électrochimique basée sur cette méthode est une mesure indirecte. Une molécule redox, appelée sonde redox, se trouve dans la solution, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ bien souvent (hexacyanure de $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$). Les pics d'oxydation et de réduction de cette espèce sont connus et facilement détectables. Les anticorps présents sur l'électrode n'empêchent pas cette analyse électrochimique, en revanche, lorsque des bactéries se fixent sur les anticorps, l'électrode se recouvre d'une couche de matériel biologique, modifiant (voire bloquant) les phénomènes de transfert de matière et donc la réponse classique de la molécule redox présente en solution.

C'est grâce à cette mesure, indirecte, que la présence d'une bactérie peut être détectée notamment par voltampérométrie¹¹⁰⁻¹¹⁵. Afin d'observer une modification significative du comportement électrochimique de la solution, un recouvrement important est nécessaire ce qui implique une certaine concentration bactérienne (entre 10 et 10^5 cfu/mL dans quelques mL).

De plus, ce type de méthode nécessite des environnements particulièrement contrôlés pour associer un changement de pics d'oxydation (ou de réduction) à la présence effective d'un micro-organisme, et non à la présence d'une autre molécule interférente. La nature même de la détection est questionnable car il est complexe de savoir réellement ce qui est mesuré par l'électrode.

Un capteur fonctionnant cette fois avec des nanoparticules magnétiques a été développé par Panhwar *et al.*¹¹⁶. La présence de bactéries est détectée par la modification (en voltampérométrie cyclique) des pics d'oxydation et de réduction due à l'importante concentration de ces particules magnétiques, fixées sur les micro-organismes puis déposées sur électrode de carbone (**Figure 1-16**, un pic de désorption semble être observé à 0,35 V). Bien que le titre indique une détection dans du sang, la méthode décrite indique bien une impossibilité de travailler dans du sang total, ce qui implique des dilutions dans du PBS et de nombreux lavages. Un procédé réalisable en laboratoire mais inenvisageable dans un milieu hospitalier et surtout inadapté à l'hémoculture.

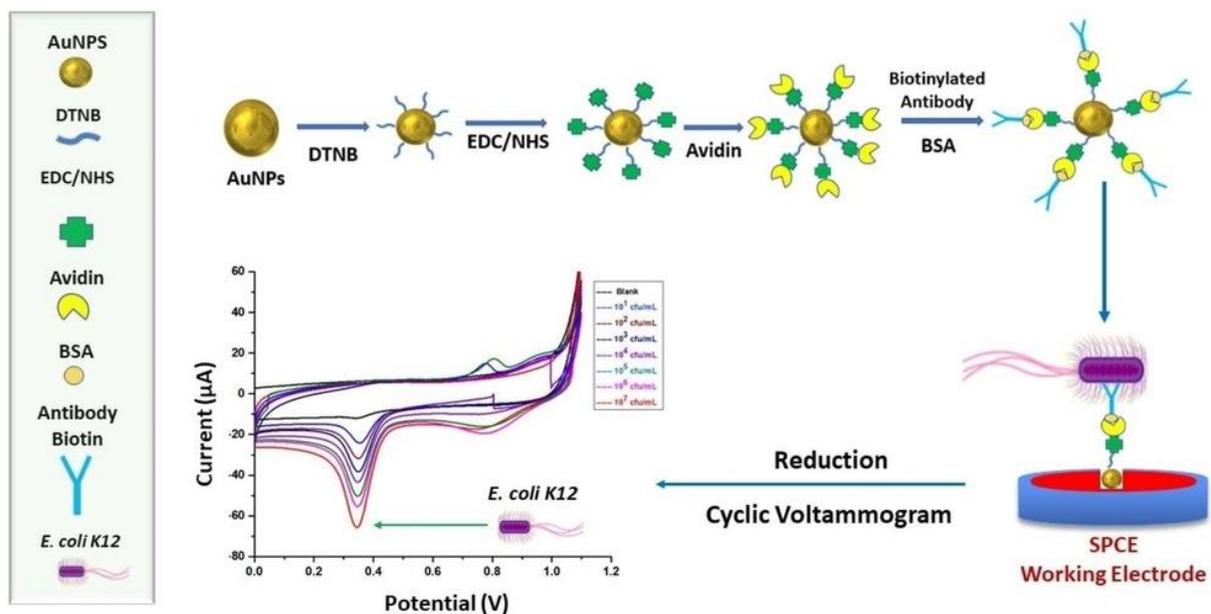


Figure 1-16 : Illustration du procédé de Panhwar *et al.*¹¹⁶ pour la capture de *E. coli* via des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des anticorps (SPCE : Screen Printed Carbon Electrode).

La spectroscopie d'impédance est également couramment utilisée comme méthode électrochimique de détection. Avec des limites de détection oscillant entre 10³ et 10⁴ cfu/mL, ce type de mesure est moins performant que les méthodes voltampérométriques, capables de fournir des limites de détection de 10¹ cfu/mL.

Plusieurs méthodes de détection existent utilisant la spectroscopie d'impédance. La mesure directe de l'impédance traduit le recouvrement de l'électrode par du matériel biologique¹¹⁷⁻¹¹⁹ dû à la liaison anticorps/bactérie. En utilisant des nanoparticules magnétiques il est possible d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la mesure¹²⁰. Tout comme les voltampérométries l'utilisation d'une sonde redox ([Fe(CN)₆]^{3-/4-}, par exemple) est également possible^{121,122}.

Comme pour les deux précédentes méthodes électrochimiques, l'ampérométrie et la conductimétrie sont utilisées pour détecter la présence de bactérie, soit avec des sondes redox¹²³, soit avec une

réaction enzymatique compétitive^{124,125}, soit avec une mesure directe du fouling (encrassement biologique de l'électrode)¹²⁶.

Afin de pallier le problème de spécificité de ce type de capteur (un capteur ne sert que pour reconnaître une bactérie donnée), El Ichi *et al.*¹²⁷ ont développé un dispositif de détection de bactéries à Gram négatif à base d'anticorps polyclonaux greffés sur des nanoparticules magnétiques. La sonde étant moins spécifique (donc une forme de « sans *a priori* »), le capteur se rapproche un peu plus des problématiques retrouvées en hémoculture. En revanche, ce procédé ne semble fonctionner que dans un milieu artificiel (ici du tampon phosphate).

Plus récemment, de nouvelles sondes sont étudiées dans le domaine de la détection bactérienne : les aptamères^{128,129}. Ce sont des oligonucléotides courts d'ADN (ou d'ARN) avec une grande affinité vis-à-vis d'analytes cibles. Leur stabilité dans des gammes de pH et de température larges ainsi que leur faible toxicité en font des sondes particulièrement intéressantes bien que l'utilisation de milieux spécifiques, propices à l'hybridation, soient nécessaires¹³⁰.

2.2.2. Utilisation d'une sonde ADN/ARN

L'identification d'une bactérie peut également être effectuée grâce à son matériel génétique. C'est d'ailleurs le principe de la PCR (décrite plus tôt dans ce chapitre), méthode nécessitant des amorces spécifiques et dont le coût par test est plus important que les méthodes de détection habituellement utilisées (cf. **Tableau 1-1**). Enfin, elle demande également une méthode de détection, la PCR n'étant que l'étape d'amplification du matériel génétique d'intérêt (*i.e.* celui ciblé grâce à l'amorce, ou *primer*). En électrochimie, l'hybridation entre une sonde nucléique de type ADN ou ARN et son brin complémentaire est perceptible. Comme pour une sonde anticorps, la sonde nucléique est fixée à une électrode, elle-même plongée dans une solution où des cellules ont été lysées.

Des sondes redox sont utilisées mais elles sont différentes de celles choisies pour la détection via liaison anticorps-antigène. On trouve par exemple le bleu de toluidine¹³¹ ou le bleu de méthylène¹³². Les limites de détection obtenues sont difficilement exploitables car elles sont reliées à la quantité de matériel génétique, exprimée en moles, et non à la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon. Un article particulièrement intéressant de Gao *et al.*¹³³ rapporte la création d'un capteur multiplexé fonctionnant dans du sang total. Ici, il est question de la détection de l'ARN ribosomal 16s de la bactérie par ampérométrie. La liaison sonde-ARN libère une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP, *horseradish peroxidase*), et cette réaction enzymatique est ensuite détectée. D'après l'auteur, ce type de capteur fonctionne dans du sang et permettrait la création d'un capteur multiplexé avec différentes sondes sur différentes électrodes.

2.2.3. Utilisation de bactériophages

Les bactériophages sont des virus infectant uniquement des bactéries. Découverts à la fin du XIX^{ème} siècle, ils sont aujourd'hui au cœur de recherches innovantes concernant de nouvelles stratégies thérapeutiques antimicrobiennes^{134,135}. Un bactériophage est capable de se fixer à une bactérie, de manière très spécifique, pour ensuite l'utiliser pour se répliquer. La grande affinité entre un phage donné et ses hôtes bactériens a longtemps été mise à profit pour réaliser du typage, en établissant des *phagovars* au sein d'une espèce, *i.e.* l'ensemble des souches qui présentent une affinité pour un phage sonde donné¹³⁶.

La spécificité des bactériophages complique leur utilisation en milieu clinique, car pour trouver le virus efficace il est nécessaire d'en posséder une diversité conséquente. En revanche, cette caractéristique peut être utilisée pour fabriquer des sondes à bactéries, soit directement avec le virus, soit avec des protéines membranaires isolées à partir de phages.

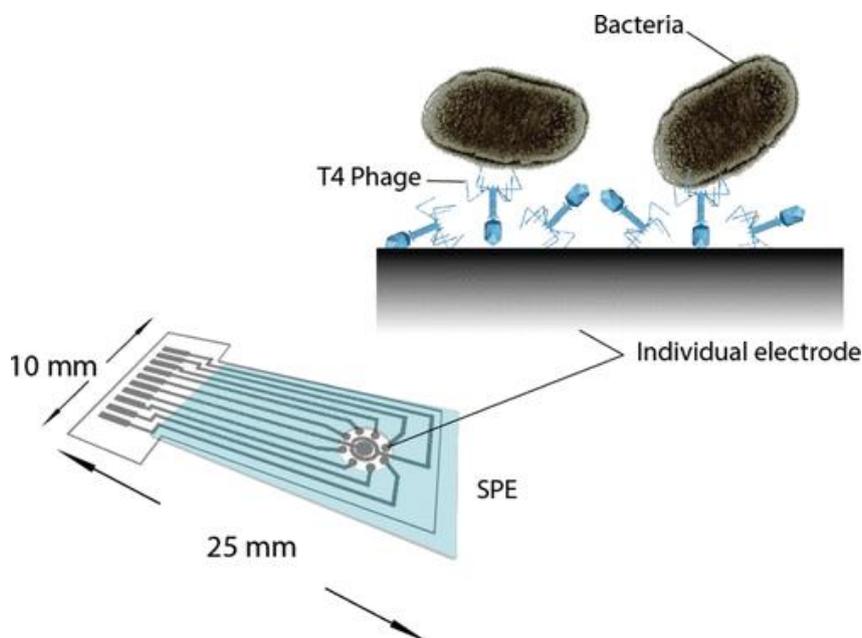


Figure 1-17 : Schéma de la méthode de Shabani *et al.*¹³⁷. Des phages T4 (spécifiques à *E. coli*) sont immobilisés sur des électrodes en carbone sérigraphié (SPE : Screen Printed carbon Electrode). La détection se fait par mesure d'impédance.

Comme avec les sondes anticorps, cette méthode permet de capturer une bactérie sur une électrode, dans un échantillon liquide. Cette liaison phage-bactérie est détectable en mesurant l'évolution de l'impédance^{137,138} qui augmentera en fonction du nombre de bactéries qui recouvriront la surface de l'électrode comme montré en **Figure 1-17**. Il est également possible d'utiliser une sonde redox¹³⁹, telle que $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, afin d'obtenir une mesure indirecte de la capture phage-bactérie.

Ce type de détection, spécifique et sans nécessité de croissance, relève tout de même d'un test avec *a priori*. Il est donc inenvisageable dans le cas de diagnostic d'infections sanguines, à moins de multiplier le nombre de sondes pour couvrir un pourcentage important des bactériémies.

2.3. Méthodes annexes

La modification d'impédance d'une électrode lors de la croissance bactérienne est déjà utilisée par quelques automates⁴⁷⁻⁵³. Plusieurs équipes de recherche¹⁴⁰⁻¹⁴² travaillent à optimiser et miniaturiser ce type de mesure afin de pouvoir fabriquer des dispositifs *point of care* (utilisation au chevet du patient).

D'autres méthodes innovantes sont également investiguées. On peut noter par exemple l'utilisation des propriétés diélectriques de certains micro-organismes pour les détecter, les identifier et quantifier leur biomasse dans un échantillon¹⁴³.

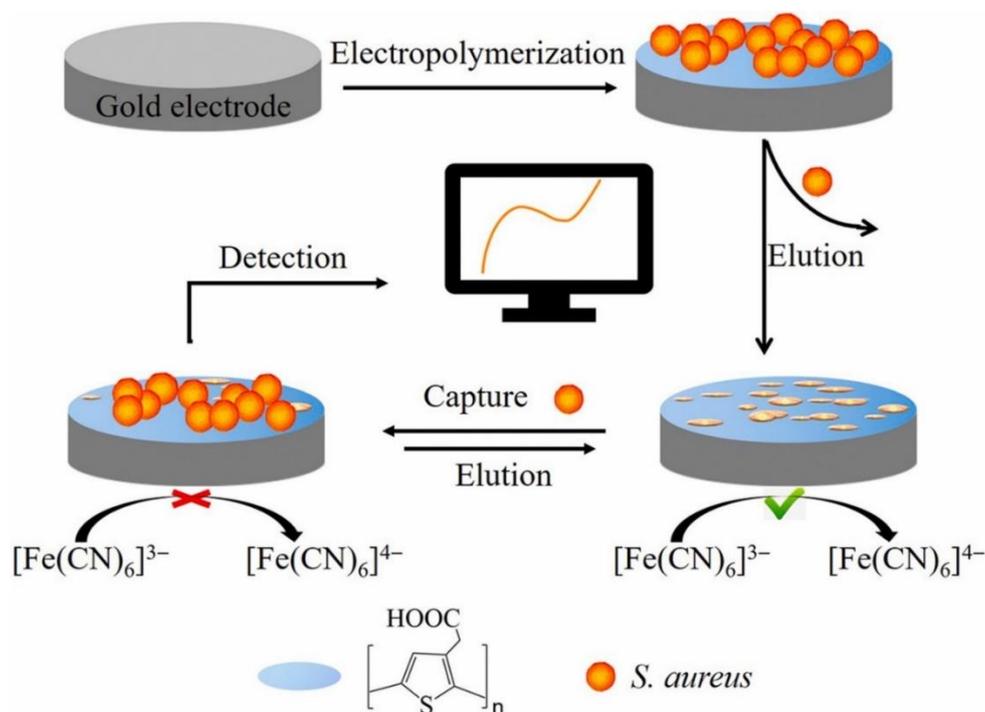


Figure 1-18 : Utilisation d'un polymère à imprégnation moléculaire élaboré par des bactéries, développé par Wang *et al.*¹⁴⁴. La capture de *S. aureus* bloque une réaction ici avec $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, détectable électrochimiquement par spectroscopie d'impédance.

Une récente étude de Wang *et al.*¹⁴⁴ rapporte un procédé particulier pour s'affranchir de sonde. Le *molecular imprinting* consiste à créer des cavités ayant une forte affinité chimique avec une bactérie donnée, en moulant au préalable un polymère réticulé autour d'un micro-organisme cible (MIP, *Molecular Imprinted Polymer*). L'analyse électrochimique par impédance, en utilisant une sonde

redox (si le transfert de matière est bloqué par le recouvrement de l'électrode alors l'activité de la sonde est modifiée) permet la détection (**Figure 1-18**).

La spécificité de cette méthode en fait sa faiblesse, une telle électrode ne reconnaîtra que l'espèce (voire la souche) dont l'empreinte a été réalisée.

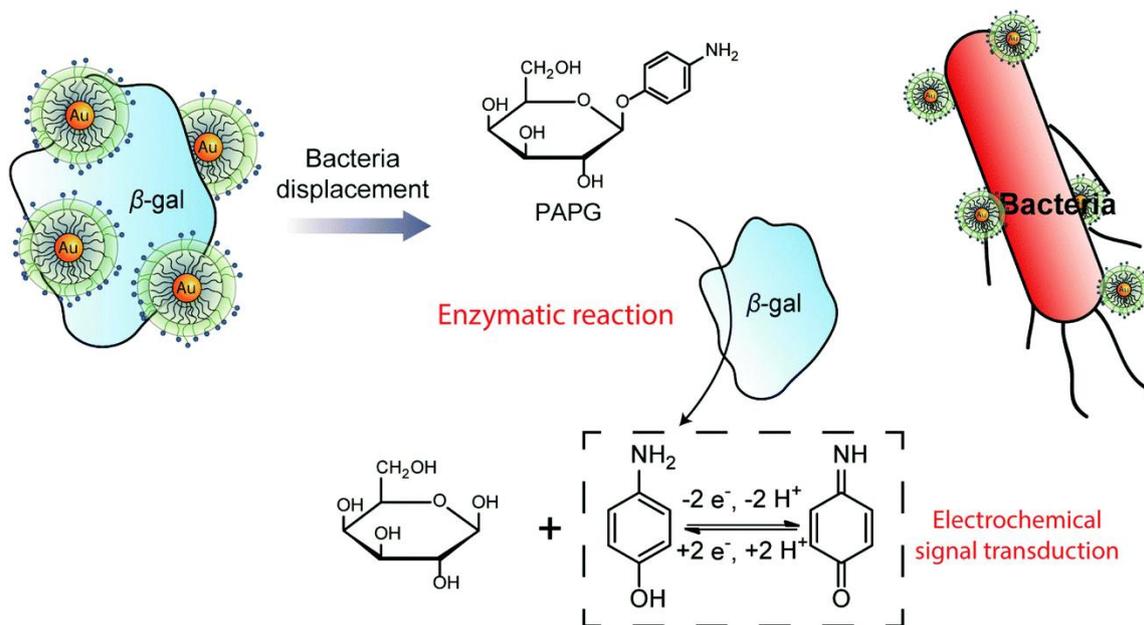


Figure 1-19 : Schéma représentant la méthode utilisée par Chen *et al.*¹⁴⁵ afin de détecter *E. coli*. En présence de bactéries, les nanoparticules d'or fonctionnalisées « libèrent » le site actif de l'enzyme pour se lier préférentiellement au micro-organisme. La réaction enzymatique est détectée par électrochimie.

Enfin, Chen *et al.* rapportent l'utilisation de nanoparticules d'or chargées positivement en complément avec une enzyme, la β -D-galactosidase, dans une solution d'eau contenant un substrat spécifique (le 4-aminophenyl- β -galactopyranoside)¹⁴⁵.

Par interactions électrostatiques, les nanoparticules se lient (de façon réversible) aux résidus chargés négativement autour du site actif de l'enzyme. Cette liaison empêche l'hydrolyse du substrat et donc la production du 4-aminophenol, détectable en voltampérométrie impulsionnelle différentielle.

Le système est créé pour assurer une interaction électrostatique plus forte entre les nanoparticules et la surface d'une bactérie (ici *E. coli* mais la méthode a été testée aussi sur *S. aureus*). En présence de celle-ci, le site actif de la β -D-galactosidase n'est plus lié à une nanoparticule, permettant ainsi la réaction enzymatique d'hydrolyse (**Figure 1-19**).

Le seuil de détection, de 10^2 cfu/mL, n'est pas un avantage suffisant pour compenser la limite inhérente à cette méthode : un milieu simple est nécessaire. L'utilisation d'un fluide biologique tel que le sang n'est pas envisageable dû à sa complexité en termes de cellules, d'enzymes et de molécules diverses.

Ce type de procédé, par mesure indirecte via une activité enzymatique, semble fonctionner avec d'autres enzymes, comme l'uréase¹⁴⁶, à condition d'adapter les protocoles et la méthode de détection (ici une mesure d'impédance).

2.4. Conclusions sur l'intérêt de l'électrochimie en microbiologie

La microbiologie est utilisée en électrochimie dans certaines technologies, que ce soit pour de la production d'énergie dans des biopiles bactériennes¹⁴⁷ ou enzymatiques¹⁴⁸, la dépollution de milieux¹⁴⁹ ou de la production de molécules d'intérêt, tel que le méthane, via des transferts d'électrons directs inter-espèces (DET)¹⁵⁰.

Concernant la détection de micro-organismes, de nombreuses méthodes existent. De la détection de molécules produites par l'espèce bactérienne à l'utilisation de sondes permettant la fixation de bactéries à l'électrode, l'ensemble de ces procédés reste toutefois loin d'une application en milieu hospitalier. La quantité de réactifs, la complexité des manipulations (non automatisables) et surtout la nécessité d'électrolytes contrôlées peuvent faire penser que l'électrochimie restera une discipline réservée au laboratoire de recherche.

Cependant, il ne faut pas minimiser les avantages de cette science. La capacité de capter des signaux spécifiques à des molécules données, le coût relativement bas de l'instrumentation et la grande diversité des matériaux utilisables font de l'électrochimie un champ d'investigation légitimement intéressant pour des dispositifs médicaux.

Contrairement à une mesure optique, un monitoring électrochimique n'est pas impacté par la turbidité ou le caractère diffusant d'un milieu, ni même par le passage d'une paroi opaque à une longueur d'onde d'intérêt.

L'enjeu majeur est d'obtenir une mesure fiable, reproductible et pertinente dans des milieux biologiques complexes.

3. L'approche de la thèse : l'analyse électrochimique sans *a priori*

3.1. Problématiques des hémocultures actuelles

Pour réduire le temps de diagnostic d'une bactériémie, plusieurs stratégies sont possibles et éventuellement cumulables.

Augmenter le volume de prélèvement : augmentation du nombre de bactéries présentes.

L'augmentation du volume de sang prélevé est une problématique discutée depuis plusieurs années, une mise en culture de 3 paires de flacons (aérobie et anaérobie) semble être optimale pour un prélèvement initial¹. Cette stratégie d'amélioration relève des bonnes pratiques cliniques.

Augmenter la sensibilité de détection.

L'augmentation de la sensibilité des méthodes actuellement utilisées est un axe, certes intéressant, mais non étudié pendant ce doctorat. Cependant, une nouvelle méthode de mesure, comme celle développée et expliquée dans la suite de ce manuscrit, peut effectivement permettre de meilleures sensibilités.

Utiliser une technologie de rupture : identification rapide et/ou un antibiogramme rapide (par exemple en réalisant ces analyses directement sur l'hémoculture positive).

Les technologies de rupture présentées en début de chapitre ne sont pas optimales sur plusieurs axes. L'importante spécificité des mesures ainsi que la nécessité de machines encombrantes et coûteuses donc d'un laboratoire centralisé, rend leur utilisation à grande échelle, et plus spécifiquement dans les pays en voie de développement où l'antibiorésistance est la plus répandue, très complexe.

Réduire ou utiliser le temps de transport du flacon d'hémoculture.

La réduction ou l'utilisation du temps de transport des flacons d'hémoculture est une problématique technologique et logistique intéressante. En effet, le temps de transport représente plusieurs heures de temps inutile au diagnostic, avec une moyenne de 10h, ce qui retarde considérablement la prise en charge efficace¹⁵.

Cette dernière stratégie d'amélioration conduit à deux grands axes de recherche en terme de gestion logistique de l'hémoculture (aussi appelé « microbiologistique »²⁰) :

Débuter l'analyse dès la prise de sang

→ Le temps de transport devient du temps utile ;

« Rapprocher le laboratoire d'analyse » du patient

→ L'échantillon est pris en charge plus rapidement.

Une entreprise suédoise, Q-linea, développe actuellement un incubateur portable (le Podler®), permettant de débiter la mise en culture et la mesure directement après prélèvement sans risque de faux positif. La mesure se fait toujours par méthode optique, utilisant le même principe que les flacons BACT/ALERT®. Le diagramme d'utilisation de ce dispositif est présenté en **Figure 1-20**, où on observe clairement un gain de temps. En revanche, la logistique de cette stratégie est compliquée et peut s'avérer coûteuse : il est en effet nécessaire de ramener ces incubateurs portables au chevet des patients et d'en prévoir les maintenances. Un stock important est donc obligatoire ainsi que des navettes faisant le trajet laboratoire/hôpital « à vide ».

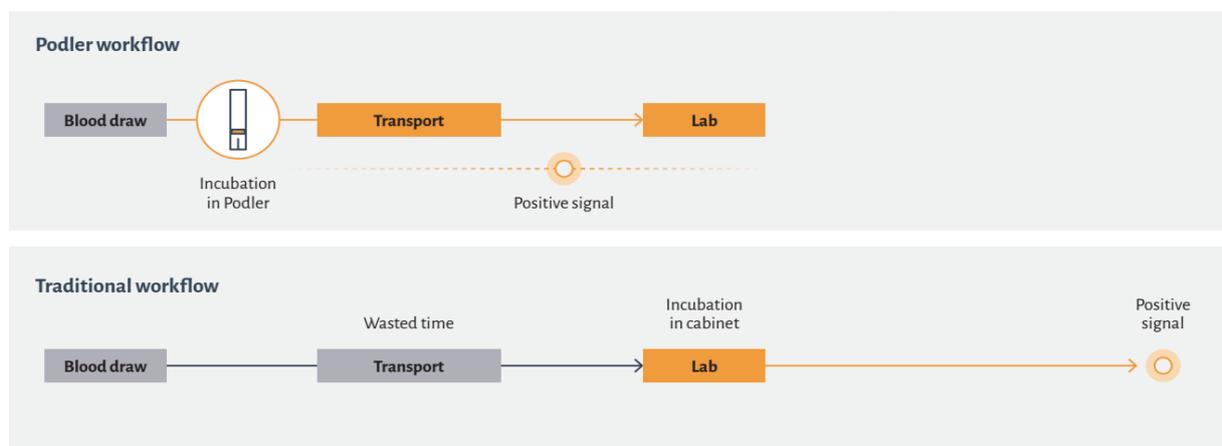


Figure 1-20 : Diagramme d'utilisation du Podler® permettant l'utilisation du temps de transport pour débiter la détection. (Source : Brochure Podler 2022 - <https://www.qlinea.com/>).

Pour pallier ces problèmes logistiques, il serait intéressant de développer un dispositif avec un automate de mesure portable très léger, peu encombrant et peu coûteux : le retour de l'appareil de mesure portatif serait plus simple et les maintenances moins régulières.

3.2. Le flacon instrumenté par des capteurs électrochimiques

Le sujet de cette thèse a cherché à rassembler les deux axes d'amélioration précédemment cités, en développant un flacon d'hémoculture instrumenté par des capteurs électrochimiques. Les avantages d'un tel dispositif sont multiples.

- Tout d'abord, tel le Podler® de Q-linea, il permet de débiter la mise en culture et la détection au chevet du patient, accélérant ainsi le diagnostic.
- Ensuite, la mesure étant embarquée dans le flacon d'hémoculture, il serait utilisable dans des contextes où un automate optique (coûteux et encombrant) n'est pas envisageable.
- Enfin, l'utilisation de plusieurs électrodes, voire de plusieurs méthodes électrochimiques en parallèle, conduit à un signal multiparamétrique. Une mesure multiplexée en électrochimie est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas un appareillage important. La réponse ainsi obtenue n'est alors plus binaire (positif ou négatif) mais peut être mesurée de façon continue dans le temps. Elle peut donc être utilisée pour obtenir des informations sur le micro-organisme détecté. On rapproche ainsi virtuellement le laboratoire, sous forme de flacon, du patient.

Le point de départ de ce doctorat a donc été la création d'un flacon instrumenté avec des capteurs pH pour mettre à profit le temps de transport entre le patient et le laboratoire d'analyse. En effet, le dioxyde de carbone est un métabolite microbien universel, l'augmentation de sa concentration dans un liquide, même tamponné tel que le sang total, engendre une diminution du pH. L'objectif premier était donc de détecter cette variation de pH par électrochimie. Cette idée, portée par mes encadrants Maxime Gougis et Pierre Marcoux, a donné lieu à un brevet en 2021¹⁵¹.

La culture bactérienne engendre de nombreuses contraintes à prendre en compte. Le cahier des charges de ce dispositif était donc le suivant :

- ✓ Matériaux d'électrodes sensibles au pH et non bactéricides ;
- ✓ Instrumentation compatible à la détection (pas de fuite) ;
- ✓ Possibilité de stériliser par autoclave les électrodes sans dégrader leurs performances ;
- ✓ Possibilité de mesurer un potentiel stable dans un milieu biologique complexe pendant au moins 5 jours (temps d'un négatif à l'hôpital).

La création d'un banc de mesure adapté a donc été le premier verrou technologique à débloquent lors de ce doctorat. Le chapitre suivant revient en détails sur les choix effectués pour concilier au mieux la réponse aux différentes contraintes, la faisabilité dans un environnement de recherche scientifique et un objectif final de semi-industrialisation. En effet, tout au long de cette thèse, l'approche industrielle est restée sous-jacente afin de ne pas perdre de vue l'usage, réel enjeu d'un dispositif de santé.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1. Rappels théoriques

1.1. Bactéries et métabolisme

1.1.1. Définitions

Les bactéries sont des êtres vivants procaryotes unicellulaires microscopiques. La majorité des bactéries mesure entre 0,5 et 1,5 μm ce qui permet de stériliser un liquide par filtration dite stérilisante avec un filtre ayant des pores de 0,2 μm .

L'ensemble des réactions biochimiques se déroulant dans la cellule bactérienne est appelé le métabolisme bactérien. En prélevant des nutriments à son environnement, puis en les transformant, la cellule peut ainsi se multiplier, communiquer, se déplacer et éventuellement se différencier¹.

En laboratoire, les bactéries sont cultivées dans des boîtes de Petri contenant des milieux nutritifs gélosés puis dispersées dans une solution liquide afin d'obtenir des unités bactériennes aussi appelées *Colony Forming Unit* (cfu). Une unité correspond à la quantité de bactéries nécessaire pour former une colonie une fois étalées sur boîte de Petri.

1.1.1.1. Les biofilms bactériens

Afin de maximiser leurs chances de survie, les bactéries forment très souvent des biofilms : une communauté, mono- ou poly-microbienne, de bactéries fixées sur une surface solide (inerte ou vivante). Cette communauté est entourée de matrice extracellulaire² (**Figure 2-1**) et se caractérise par un phénotype et un métabolisme caractéristiques de l'état biofilm, potentiellement très différents de l'état planctonique. Cette structure biologique permet une résistance particulière des bactéries aux agressions extérieures, aux réactions immunitaires et aux antibiotiques^{2,3}. Le biofilm constitue le mode de vie privilégié de la plupart des micro-organismes.

En effet, les couches basales du biofilm seront naturellement moins alimentées en oxygène et en nutriments ce qui induit un stress de ces micro-organismes. Ces conditions extrêmes forcent les bactéries à s'adapter en modifiant leur métabolisme. C'est ainsi qu'il est possible d'observer un passage de l'aérobiose à l'anaérobiose au sein d'un biofilm bactérien⁴.

La pluralité des comportements métaboliques lors de la formation d'un biofilm en fait un organisme plus complexe, favorisant l'apparition de mutations génétiques, qui sera plus résistante aux antibiotiques classiquement utilisés contre l'espèce en question.

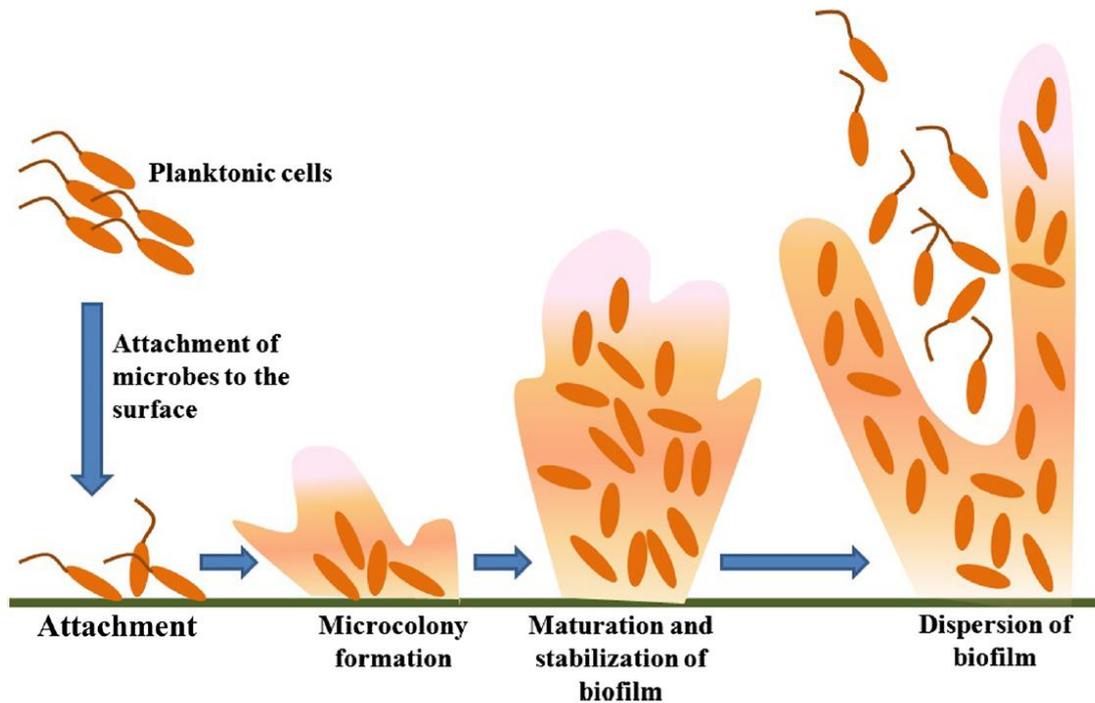


Figure 2-1 : Processus de formation d'un biofilm par Gupta *et al.*⁴. Les cellules planctoniques s'attachent de manière réversible à une surface puis cette liaison devient irréversible. Une colonie se forme alors sur la surface, en biofilm, puis se stabilise. La colonisation d'une nouvelle surface est permise par la dispersion des bactéries situées sur les couches extérieures du biofilm.

1.1.1.2. Le Gram des bactéries

Les bactéries peuvent se diviser en deux grands groupes suivant la composition de leur membrane cellulaire : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Les membranes des bactéries à Gram positif sont composées d'une membrane lipidique puis d'une couche épaisse de peptidoglycanes, sans lipopolysaccharides. Les bactéries à Gram négatif sont quant à elles composées d'un empilement d'une membrane lipidique, d'une fine couche de peptidoglycanes puis d'une membrane en lipopolysaccharides (**Figure 2-2**). Il est ainsi possible de schématiser :

- Gram positif → membrane cellulaire simple ;
- Gram négatif → double membrane cellulaire.

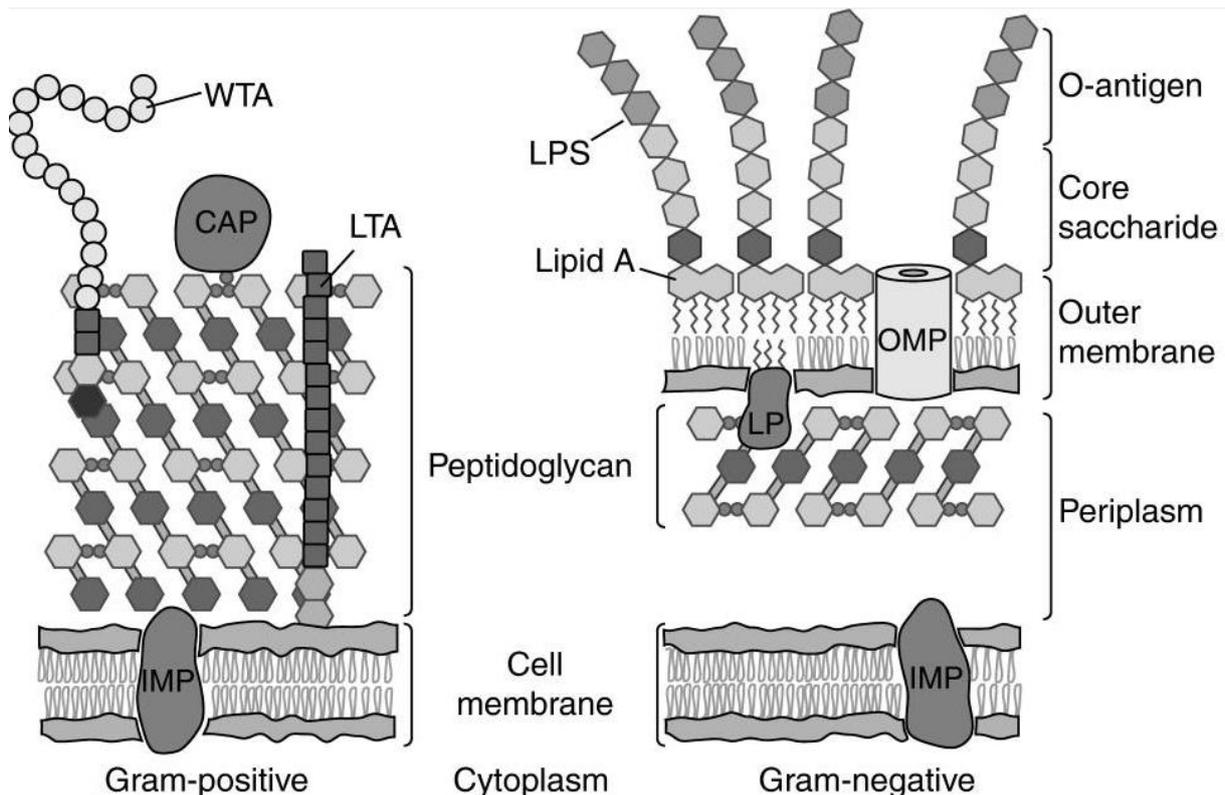


Figure 2-2 : Représentation des membranes cellulaires des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.⁵ (CAP = protéine liée par liaison covalente; IMP = protéine de membrane intégrale; LP = lipoprotéine; LPS = lipopolysaccharide; LTA = acide lipotéichoïque; OMP = protéine membranaire externe; WTA = acide téichoïque mural).

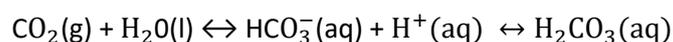
Cette distinction est une donnée cruciale pour ajuster le traitement du patient. La membrane cellulaire étant la première ligne de défense de la bactérie, l'antibiothérapie est dépendante de cette information.

C'est pour cette raison que la coloration de Gram est la première étape du diagnostic. Ce test nécessite du personnel qualifié et des réactifs chimiques toxiques mais il demeure rapide (moins de 30 minutes en général) et peu coûteux.

1.1.2. Métabolisme bactérien

Pour qu'une cellule puisse vivre, se diviser et se reproduire, un grand nombre de réactions chimiques ont lieu. L'immense majorité des bactéries d'intérêt clinique produit du dioxyde de carbone via leur métabolisme, que leur croissance soit aérobie (avec oxygène) ou anaérobie (sans oxygène).

Une molécule de dioxyde de carbone en présence d'eau se dissout pour former un ion bicarbonate et un proton. On assiste alors à un équilibre chimique entre le dioxyde de carbone, l'ion bicarbonate et l'acide carbonique :



L'eau étant en excès, une augmentation de la concentration en CO_2 entrainera une augmentation de la production de protons. Cette diminution du pH pourra atteindre alors la valeur de 6,4, le pK_a du couple acidobasique $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$. Chez l'humain, la valeur du pH sanguin se situe autour de 7,4⁶ donc seulement une unité au-dessus du pK_a de $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$.

Quasiment toutes les technologies de détection en hémoculture présentées au **Chapitre 1** cherchent à détecter cette augmentation de la concentration en dioxyde de carbone dans le flacon.

1.2. Mesure du pH

Le potentiel hydrogène ou pH d'une solution, est la mesure de l'activité chimique des protons présents dans la solution. Il est utilisé pour déterminer l'acidité ou l'alcalinité d'une solution. Plusieurs méthodes sont possibles pour déterminer le pH d'une solution.

1.2.1. Indicateur colorimétrique

Dans certains couples acides/bases faibles, l'acide et la base possèdent des spectres d'absorbance différents dans le visible. C'est pourquoi la couleur d'une solution aqueuse d'un tel couple dépendra du pH : on parle d'indicateur colorimétrique. La majorité de ces chromophores ne possède que deux ou trois couleurs avec une zone de virage relativement étendue ($\text{pK}_a \pm 10\%$), ce qui rend la mesure du pH peu précise.

En revanche, cette méthode très pratique et peu coûteuse est bien adaptée à une mesure qualitative. On retrouve notamment ce type d'indicateur, comme le bleu de bromothymol ou le bleu xylénol employés dans les automates d'hémoculture BACT/ALERT^{®7,8}.

1.2.2. Le pH-mètre

En chimie, le pH-mètre est un appareil couramment utilisé. Il est composé d'une sonde pH-métrique, d'une sonde de température et d'un potentiomètre permettant la lecture de la mesure.

La sonde pH utilisée est composée de deux électrodes : une électrode de mesure et une électrode de référence. En effet, la mesure d'un potentiel électrochimique n'est pas absolue, il s'agit d'une mesure de différence de potentiel.

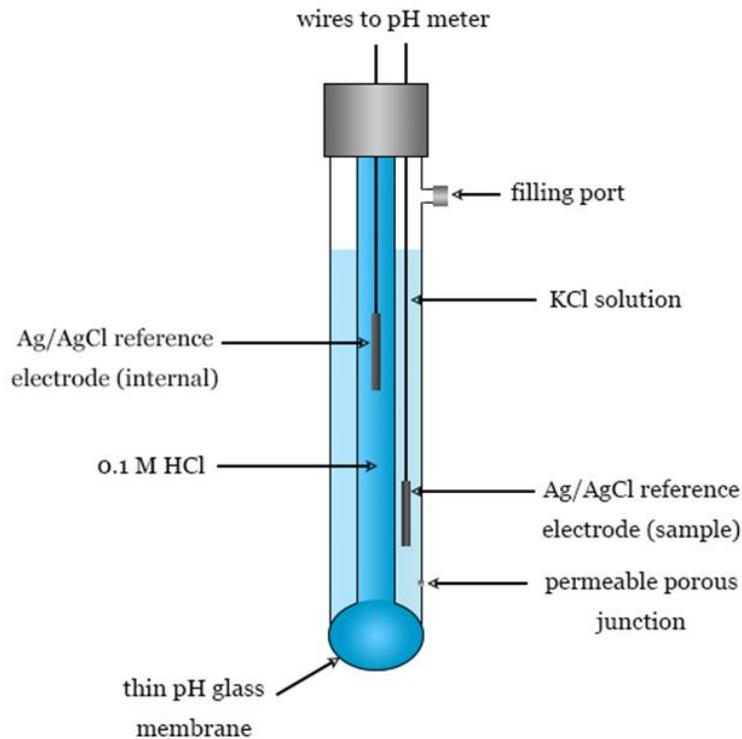


Figure 2-3 : Electrode combinée d'un pH-mètre⁹ classiquement utilisé en laboratoire.

La sonde classiquement utilisée est une sonde combinée, où une électrode de référence Ag/AgCl est immergée dans une solution de KCl saturée, le tout dans un corps en verre borosilicate qui est utilisé comme électrode de mesure (voir **Figure 2-3**).

Lorsque la sonde est immergée dans une solution, des ions hydrogène et métalliques se déplacent de la solution vers la surface de l'électrode de verre mais également de l'intérieur de l'électrode de verre vers sa surface. Ces déplacements d'ions sont permis grâce à la nature de la solution interne de l'électrode de verre (riche en ions hydrogène libres). Il en résulte la génération d'un potentiel de Donnan : un potentiel transmembranaire d'une membrane conductrice ionique qui génère un effet capacitif du fait de l'accumulation (sélective) des espèces ioniques cibles de part et d'autres de la membrane.

Le potentiel de l'électrode de référence est rendu stable via l'utilisation du couple électrode/électrolyte choisi, permettant un double équilibre représenté par les équations :



Afin d'obtenir une mesure fiable, un pH-mètre doit être étalonné avec des solutions tampons. C'est un instrument fragile, coûteux et encombrant. Son utilisation est donc limitée au laboratoire.

1.2.3. Les encres conductrices

Certains cas nécessitent l'utilisation d'un capteur en dehors du laboratoire, comme par exemple la mesure du pH de l'eau de piscine (Swan Analytical Instruments), le monitoring des fluides biologiques présents sur une prothèse ou bien la détection de croissance bactérienne dans un flacon d'hémoculture. Afin de s'affranchir des problèmes de coûts et d'encombrement des pH-mètres « classiques », des modifications du dispositif de mesure sont nécessaires.

Une technique couramment répandue dans la littérature scientifique consiste en l'utilisation de matériaux sensibles au pH et utilisés sous forme d'encres. La mesure étant une différence de potentiel, il est également nécessaire d'utiliser une électrode de référence avec une encre non sensible au pH et dont le potentiel restera constant.

Les matériaux sensibles au pH sont nombreux, il s'agit essentiellement d'oxydes métalliques mais différents polymères conducteurs, tels que la polyaniline, sont utilisés. Dans cette thèse, nous avons privilégié le dépôt d'encres comme méthode de fabrication pour nos électrodes. L'utilisation de techniques de couchage comme la sérigraphie sont des procédés envisageables pour une future industrialisation.

2. Choix de la méthode de mesure

L'objectif initial de cette thèse étant de détecter une variation de pH, la potentiométrie à intensité de courant nulle (système à deux électrodes) a été la méthode la plus utilisée.

Pour approfondir la compréhension des phénomènes observés, des analyses électrochimiques à intensité de courant non nulle (par spectroscopie d'impédance) ont également été nécessaires (voir **Chapitre 4**).

2.1. Description de la potentiométrie

La potentiométrie à intensité de courant nulle est la détermination du potentiel de circuit ouvert, ou potentiel d'abandon, d'une électrode de travail par rapport à une électrode de référence (**Figure 2-4**). Cette méthode est celle utilisée pour déterminer le pH d'une solution. On utilise alors une électrode de référence dont le potentiel est constant dans la gamme de pH prévue. Le matériau de l'électrode de travail est choisi de manière à ce que sa réaction avec des protons entraîne un changement de son potentiel électrochimique.

Une mesure potentiométrique ne requiert pas d'appareil de mesure complexe, l'acquisition peut se faire sur des potentiostats miniaturisés, voire des multimètres numériques, car une impédance

d'entrée très importante n'est pas nécessaire avec des encres conductrices. En effet, une électrode de verre a une impédance élevée (entre 50 et 500 M Ω), un potentiostat à très forte impédance d'entrée est donc utilisé pour limiter les erreurs de mesure¹⁰, ce qui n'est pas le cas avec l'utilisation d'encres conductrices. En revanche, l'utilisation d'un multimètre de mauvaise qualité occasionnera des courants de fuite importants, une attention particulière est donc nécessaire concernant l'appareil de mesure.

La mesure potentiométrique est donc un avantage certain pour une méthode de diagnostic s'adressant au plus grand nombre, y compris à des petites structures de santé et aux pays en voie de développement.

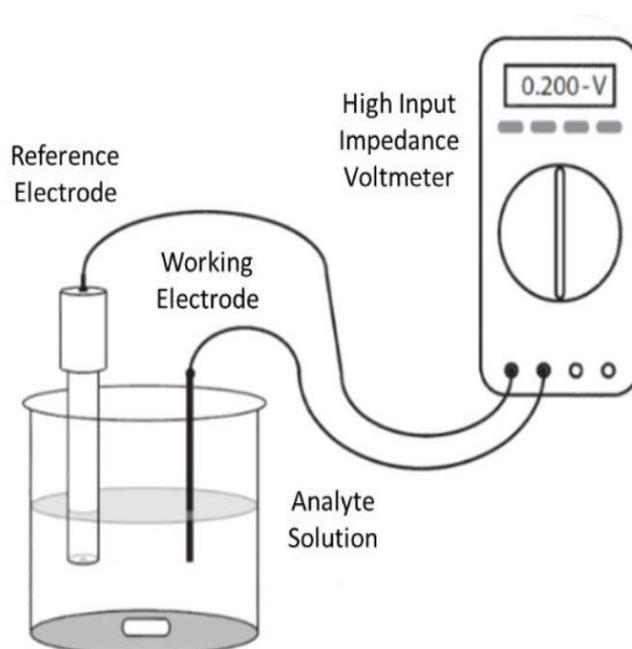


Figure 2-4 : Mesure potentiométrique entre une électrode de travail métallique et une électrode de référence, par un voltmètre à haute impédance.

2.2. Description de la spectroscopie d'impédance

La spectroscopie d'impédance, notée EIS (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*), est une méthode permettant d'étudier les interfaces électrochimiques à travers l'analyse de signaux électriques.

Un signal d'entrée sinusoïdal (généralement le potentiel complexe $\bar{U} = Ue^{j\varphi_1}$) est imposé au système qui fournit un signal de sortie (généralement le courant complexe $\bar{I} = Ie^{j\varphi_2}$) lui aussi sinusoïdal. La variation d'amplitude du potentiel est habituellement fixée à 10 mV, une valeur suffisamment faible pour supposer que la réponse du système est linéaire.

L'EIS est l'étude des décalages de phase et des variations d'amplitude, entre l'entrée et la sortie, en fonction de la fréquence appliquée. Outre le transfert de matière (par diffusion ou par convection par exemple) deux phénomènes peuvent ainsi être observés :

- Les comportements électro-physiques, visibles plutôt à hautes fréquences et correspondant à la migration des charges (phénomène résistif) ou à l'accumulation de charges à l'interface (phénomène capacitif) ;
- Les comportements électrochimiques (faradiques), visibles plutôt à basses fréquences et correspondant à un transfert de charge via des réactions d'oxydo-réduction.

L'impédance $\bar{Z} = \bar{U}/\bar{I}$ étant une grandeur complexe, deux représentations graphiques sont couramment utilisées :

- **Le diagramme de Nyquist inverse.** Pour chaque fréquence, l'opposé de la partie imaginaire de l'impédance est représenté en fonction de sa partie réelle.
- **Le diagramme de Bode.** Les évolutions du module de l'impédance et de la phase sont tracées en fonction de la fréquence.

Les informations fournies par la spectroscopie d'impédance peuvent permettre de mieux analyser un système électrochimique, notamment grâce à sa modélisation via des schémas électriques équivalents.

Exemples de schémas équivalents en EIS.

Pour modéliser électriquement un système électrochimique simple (**Figure 2-5**), on trouve tout d'abord la résistance (R_s) de l'électrolyte en série avec :

- Un condensateur (C_{dl}) en parallèle avec une résistance de transfert de charge (R_{ct}) et un élément appelé impédance de Warburg (W), si l'impédance dépend des phénomènes de **diffusion linéaire semi-infinie** de l'espèce redox impliqué dans le phénomène faradique (modèle de Randles = modèle le plus simple) ;
- Un condensateur (C_{dl}) en parallèle avec une résistance de transfert de charge (R_{ct}), si l'impédance **ne dépend pas** des phénomènes de diffusion.

La capacité C_{dl} représente la double couche électrochimique tandis que la résistance de transfert de charge R_{ct} modélise les processus faradiques, c'est-à-dire la barrière de potentiel à franchir pour initier les réactions d'oxydo-réduction.

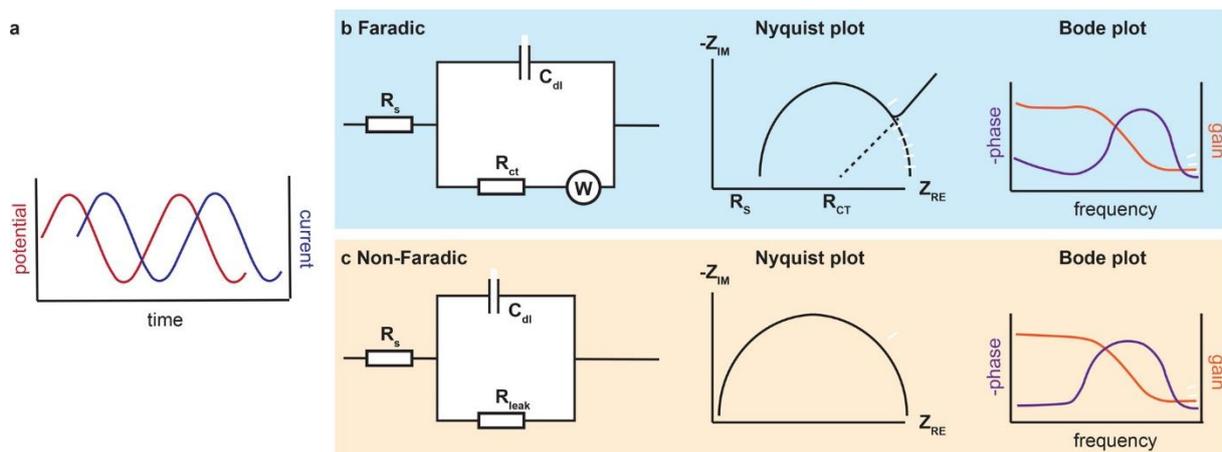


Figure 2-5 : Représentation de la spectroscopie d'impédance¹¹. (a) Signaux d'entrée et de sortie lors d'une mesure d'impédance. (b) Schéma équivalent et diagrammes du modèle de Randles. (c) Schéma équivalent et diagrammes pour un système où la diffusion n'intervient pas.

3. Fabrication du banc de mesure

3.1. Cahier des charges du dispositif de mesure

Pendant l'ensemble de la thèse, un modèle de flacon d'hémoculture instrumenté a été utilisé pour effectuer des mesures aussi reproductibles et fiables que possible. L'instrumentation de flacons d'hémoculture commerciaux est une option qui n'a pas été retenue à cause d'une mise en œuvre trop complexe et dangereuse pour l'expérimentateur du point de vue de la contamination : le joint créé entre le flacon (percé) et la plateforme électrochimique ne résistait pas à l'autoclave, ce qui engendrait des fuites du liquide après remplissage.

La création d'un prototype de flacon a donc été soumise à un ensemble de spécifications, répondant à des fonctions, et dont les solutions sont résumées dans le **Tableau 2-1**.

Tableau 2-1 : Résumé du cahier des charges et des solutions choisies concernant le prototype de flacon d'hémoculture instrumenté

Fonction primaire	Fonction secondaire	Solutions choisies
Assurer la sécurité de l'expérimentateur pendant la manipulation du dispositif.	Eviter la possibilité de contamination par casse du flacon.	Utilisation de flacons en polypropylène (PP).
	Garantir une étanchéité des flacons une fois contaminés : pas de contamination de l'opérateur ni de l'échantillon.	Assemblage par colle cyanoacrylate et époxy, résistante à la stérilisation par autoclave.
		Développement d'une méthode de détection de fuite pré-contamination du sang.
Réaliser une hémoculture et une mesure électrochimique.	Favoriser la croissance bactérienne dans le dispositif.	Choix de matériaux non cytotoxiques pour le flacon (PP) et pour les électrodes (membrane polyuréthane sur électrode d'Ag/AgCl).
	Garantir la stérilité du dispositif (dans le cas d'expérience sans bactérie).	Travail sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM).
	Permettre l'intégration d'un capteur électrochimique dans le flacon d'hémoculture.	Utilisation de flacons en PP pour permettre une découpe et un assemblage facile (pas de machine nécessaire).
Respecter les contraintes financières du doctorat et d'une future application.	Adapter le travail aux outils présents au CEA.	Utilisation de plateformes électrochimiques génériques, développées au DTBS lors de projets précédents ¹² .
	Permettre un grand nombre d'expériences pendant le doctorat.	Choix de consommables disponibles en grande quantité avec des coûts maîtrisés.

3.2. Conception des électrodes

Les mesures électrochimiques ont été effectuées grâce à un modèle de plateforme générique, développé par le CEA Grenoble¹² et fabriqué par la société Cibel (groupe ACB).

Cette plateforme générique, présentée en **Figure 2-6**, est un circuit PCB (*Printed Circuit Board*) sur substrat époxy avec 10 électrodes en or (8 électrodes de travail, 1 électrode de référence et 1 contre électrode). La contre-électrode n'est pas utilisée en potentiométrie.

Chaque électrode est recouverte avec une superposition d'encre et de matériaux suivant le but de l'expérience et la nature de la mesure visée. Pour chaque électrode, une sous-couche d'encre carbone (BQ242 – Dupont) est utilisée pour assurer l'adhésion des encres conductrices après stérilisation. Les encres sont soit commerciales soit formulées au laboratoire pour ce dispositif de mesure électrochimique.

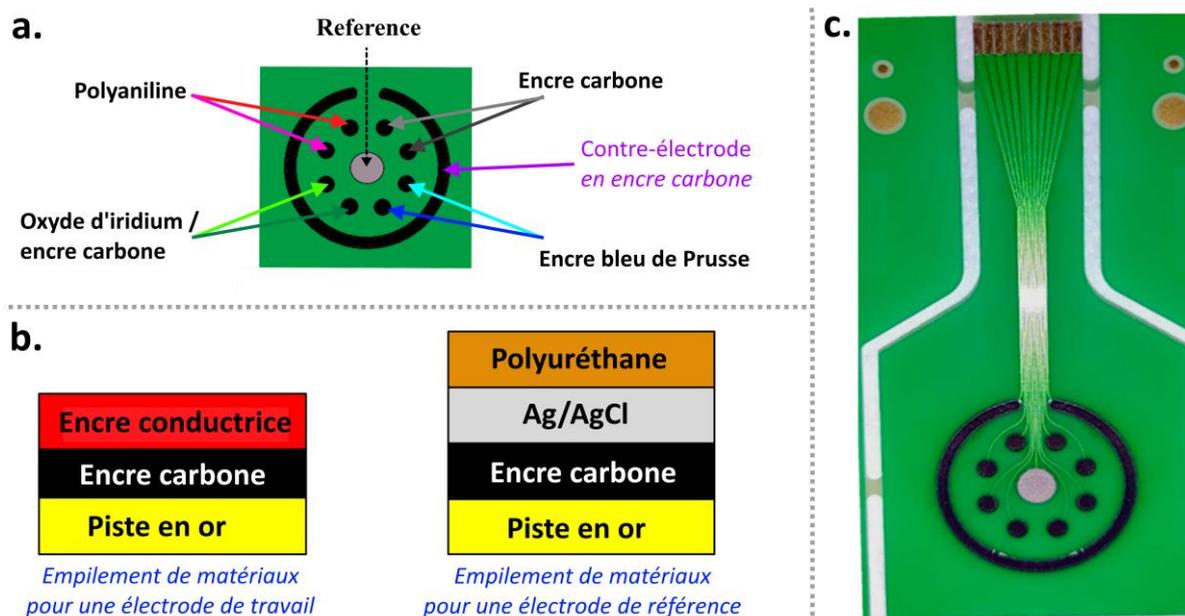


Figure 2-6 : (a.) Schéma de la disposition des différents matériaux d'électrodes sur une plateforme générique. (b.) Empilements des matériaux sur une électrode de travail et une électrode de référence. Une sous-couche d'encre carbone est présente sur toutes les électrodes. (c.) Photo d'une plateforme générique recouverte d'encres conductrices.

Toutes les encres ont été déposées à la main, sous une loupe binoculaire, et recuites à 80°C pendant 2 h au minimum. La sérigraphie n'a pas été utilisée pour des raisons pratiques internes au laboratoire mais il serait tout à fait envisageable, dans un objectif d'industrialisation, d'utiliser cette technique de fabrication.

Dans la suite de ce manuscrit, les électrodes de travail seront notées WE (pour *Working Electrode*), l'électrode de référence sera notée REF et la contre-électrode sera notée CE.

3.2.1. Electrode de travail

Quatre encres différentes ont été utilisées en tant que matériau d'électrode de travail. L'architecture de la plateforme nous a permis d'avoir, pour chaque expérience, deux électrodes de travail avec le même matériau, un moyen de s'assurer de la reproductibilité de nos mesures et de la stabilité de nos signaux.

3.2.1.1. L'encre polyaniline

La polyaniline (PANI) est un polymère conducteur électronique, stable chimiquement et possédant une conductivité électrique élevée. Il est étudié depuis des dizaines d'années^{13,14}, notamment dans le domaine des biocapteurs¹⁵⁻¹⁸ mais également couramment utilisé en tant que capteur pH^{19,20}.

Comme montré **Figure 2-7**, ce polymère possède 3 états d'oxydation différents : un état réduit (leucoéméraldine, LE), un état oxydé (pernigraniline, PE) et un état partiellement réduit et partiellement oxydé (*emeraldine base*, EB et *emeraldine salt*, ES).

Lors d'une diminution de pH, l'acidification va augmenter la proportion de formes protonées de la polyaniline et aura pour conséquence une augmentation du potentiel.

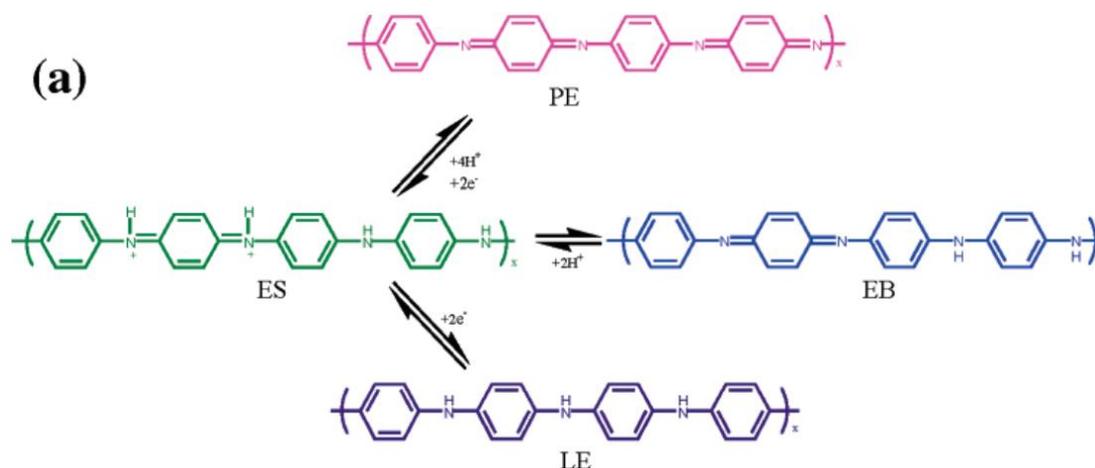


Figure 2-7 : Schéma des équilibres de la PANI montrant la réponse aux changements de pH ou de potentiel²¹

La sensibilité au pH d'une électrode de polyaniline est vérifiée en laboratoire par ajouts dosés d'acide sulfurique 99 % dans une solution de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Le PBS est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Son pH neutre, sa non toxicité et son caractère isotonique vis-à-vis

des liquides physiologiques²² en font une solution modèle intéressante pour calibrer nos électrodes. Sa composition précise est la suivante : 137 mM de NaCl + 2,7 mM de KCl + 10 mM de Na₂HPO₄ + 1,76 mM de KH₂PO₄.

Une calibration a été effectuée sur une gamme d'encres correspondant à différentes dilutions d'une encre polyaniline commerciale (**Figure 2-8**). Cette expérience a permis la mise en évidence d'une corrélation entre l'augmentation du temps de réponse (et de stabilisation) de l'électrode et l'augmentation de la concentration en PANI de l'encre.

En revanche, dans la gamme de pH étudié (7 à 4), les sensibilités des encres déposées sont semblables, entre 80 à 90 mV par unité de pH.

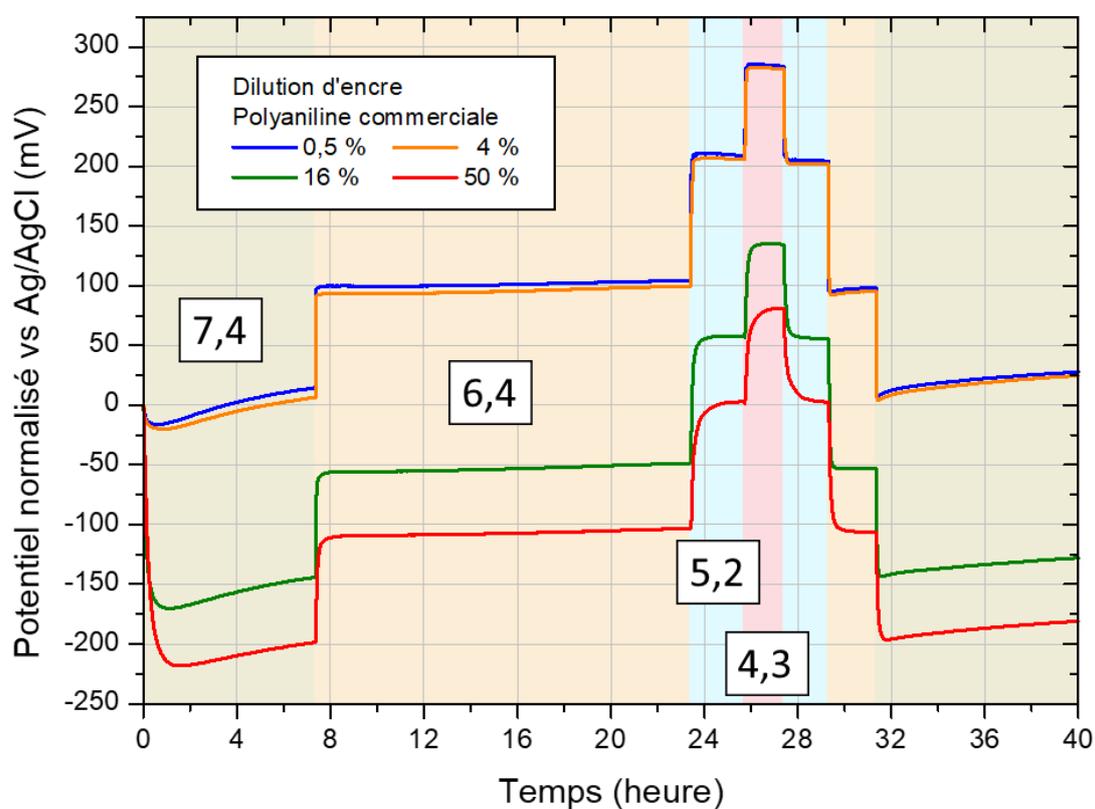


Figure 2-8 : Mesures électrochimiques du potentiel de différentes dilutions d'une encre de polyaniline commerciale, dans des solutions à différents pH. Les dilutions sont effectuées dans de l'eau distillée. Les différents pH (valeurs notées sur la courbe) sont obtenus dans des solutions de PBS 1X par ajout d'acide sulfurique 99 %. Le potentiel a été normalisé pour débuter à 0 mV vs Ag/AgCl pour chaque électrode.

Une encre de polyaniline à 50 % (500 μ L d'encre commerciale diluée dans 1 mL d'eau distillée) a été utilisée dans la suite de ce travail. En effet, le temps de stabilisation de plusieurs dizaines de minutes n'est pas un facteur limitant dans une culture de plusieurs heures.

De plus, nous avons pu remarquer que les encres de polyaniline perdent en sensibilité après une stérilisation par autoclave (**Figure 2-9**). L'encre la plus concentrée a permis un dépôt plus robuste de ce point de vue, avec une perte de « seulement » 20 mV/unité pH.

On retiendra une sensibilité de l'encre polyaniline utilisée de **-64 mV par unité pH**.

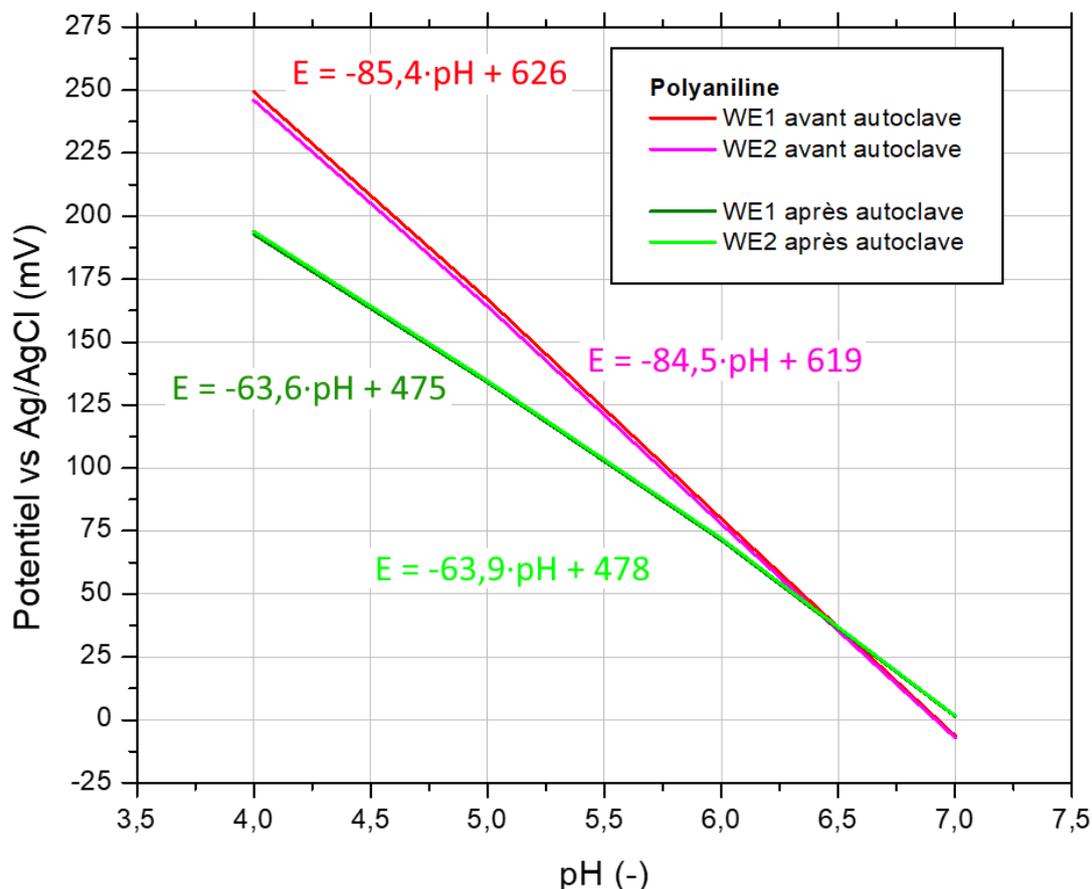
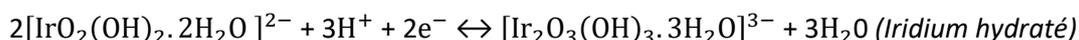
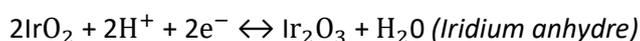


Figure 2-9 : Calcul de la modification de la sensibilité pH de la polyaniline après stérilisation par autoclave. Le processus de stérilisation occasionne ici une perte de sensibilité de 20 mV/unité pH.

3.2.1.2. L'encre oxyde d'iridium

L'iridium est un métal très rare et également très résistant à la corrosion. Il est couramment utilisé par le laboratoire d'électrochimie du DTBS¹². L'encre d'oxyde d'iridium a été fabriquée au laboratoire en mélangeant 10 mg d'Iridium(IV) Premium Dihydrate 99 % (Alfa Aesar) avec 500 mg d'encre carbone (BQ242 – Dupont) dans 500 μL de EGDA (*Ethylene Glycol Diacetate* - Sigma-Aldrich).

Grâce aux valeurs de potentiel d'équilibre observées dans du PBS (autour de 200 mV vs Ag/AgCl), il est possible de déterminer les équations d'oxydo-réduction mises en jeu lors de l'acidification de milieu de mesure²³ :



D'après la Loi de Nernst, il est possible de calculer la sensibilité théorique de ce matériau d'électrode à 25°C, elle est de 59 mV par unité de pH.

$$E = E^0 - \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{a_{red}}{a_{ox}}\right) = E^0 + \frac{0,059}{n} \log\left(\frac{a_{ox}}{a_{red}}\right) \Rightarrow \Delta E = +0,059 \cdot pH$$

Où :

- R est la constante des gaz parfaits (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) ;
- T est la température (en Kelvin) ;
- n est le nombre d'électrons transférés ;
- F est la constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹) ;
- a_{red} est l'activité chimique du réducteur et a_{ox} l'activité chimique de l'oxydant.

Une sensibilité réelle de l'encre utilisée est d'environ **-54 mV par unité de pH**. Elle a été mesurée dans des solutions de PBS avec ajout progressif d'acide sulfurique 99 % (Figure 2-10). Le temps de réponse de ce matériau est en revanche très court (quelques secondes) et cette sensibilité ne semble pas être dégradée par la stérilisation, contrairement à la polyaniline.

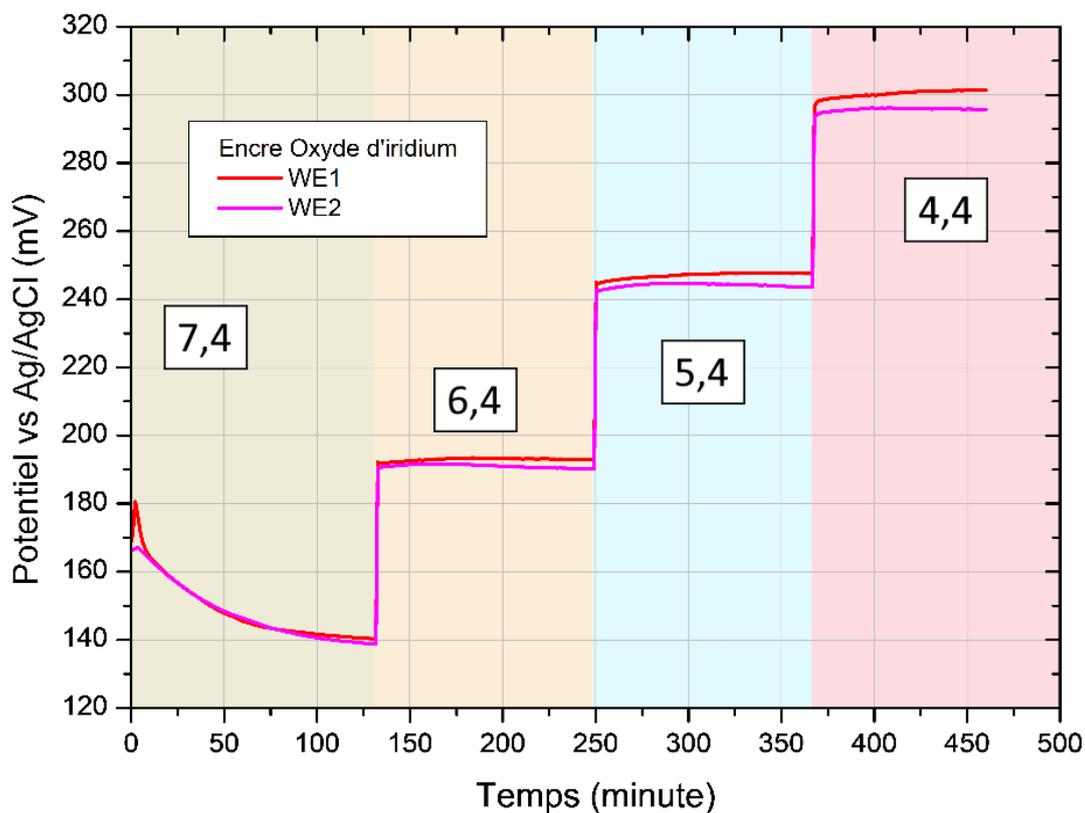


Figure 2-10 : Mesures électrochimiques du potentiel de deux électrodes (identiques) composées d'une encre oxyde d'iridium, dans des solutions à différents pH. Les différents pH (valeurs notées sur la courbe) sont obtenus dans des solutions de PBS 1X par ajout d'acide sulfurique 99 %.

Ces différences entre matériaux d'électrodes pourraient être expliqués par leurs comportements : les réactions sont plutôt surfaciques pour l'oxyde d'iridium mais majoritairement volumiques pour la polyaniline, la PANI pouvant être « comparée » en première intention à un réseau de fibres conductrices interconnectées dans lequel peuvent diffuser les espèces dissoutes (expliquant, en partie, l'important temps de stabilisation).

3.2.1.3. Les encres carbonées sans oxyde métallique

Deux encres commerciales carbonées ont également été étudiées en tant que matériau d'électrode de travail, bien qu'elles ne soient pas sensibles aux variations de pH :

- Une encre carbone non modifiée (BQ242 – Dupont), ce qui revient à laisser uniquement la sous-couche en tant que matériau d'électrode de travail ;
- Une encre carbone contenant un médiateur redox, le bleu de Prusse (C2070424P2 – Gwent).

De formule $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$, le bleu de Prusse est utilisé depuis longtemps en électrochimie notamment pour la détection de cations non électroactifs tels que les ions thallium (Tl^+), potassium (K^+) ou encore ammonium (NH_4^+)²⁴. Il est également utilisé pour la détection de la réduction du peroxyde d'hydrogène²⁵, molécule très intéressante dans le domaine des biocapteurs.

3.2.2. Electrode de référence

Il n'est pas possible d'ajouter une électrode de référence conventionnelle (avec un verre fritté et une solution interne) dans un flacon d'hémoculture, pour des raisons de perte de stérilité et d'impératif d'usage unique pour chaque flacon.

C'est pourquoi nous utilisons une électrode de pseudo-référence pour chacun des dispositifs. Elle est composée d'une sous-couche d'encre carbone (BQ242 – Dupont) puis d'une couche d'encre Ag/AgCl (5874 – Dupont). L'utilisation d'une pseudo-référence n'est pas gênante dans nos expériences car les milieux de culture étudiés sont fortement concentrés en ions chlorure (concentration stable). Par abus de langage on nommera, dans la suite de ce manuscrit, ces électrodes « électrodes de références ».

Les électrodes de référence sont également protégées avec une membrane de polyuréthane (formulée en laboratoire dans du tétrahydrofurane). Cette membrane a trois objectifs : protéger l'électrode pendant l'étape de stérilisation, éviter le relargage d'argent (bactéricide) pendant l'hémoculture et stabiliser le potentiel de l'électrode de référence. La composition exacte de cette membrane est un savoir-faire du laboratoire d'électrochimie.

3.3. Instrumentation du flacon

Des flacons en polypropylène Azlon™ ont été choisis. Leur stabilité chimique et leur résistance à l'autoclave répondaient parfaitement au cahier des charges. L'instrumentation de flacons a représenté un défi technique pendant le début de la thèse, les fuites étant fréquentes après stérilisation. La méthode définitive pour la fabrication de ce prototype est la suivante.

Une entaille horizontale est effectuée dans le flacon, à environ 3 centimètres du fond, sur 2 à 3 centimètres. Cette entaille est ébavurée au scalpel afin d'obtenir des bords francs et propres ainsi que la perforation complète de l'épaisseur du polypropylène.

Le pourtour de l'incision est ensuite poncé au papier de verre pour créer de la rugosité (ce qui aide ensuite au collage). Toute la zone est ensuite recouverte, au pinceau, avec du promoteur d'adhérence (PRIMAIRE 7239 BO 4ML LOCTITE UC10).

Une fois que les encres et la membrane sont déposées, les plateformes sont introduites dans le flacon de sorte à faire ressortir les connectiques par la fente préalablement créée.

Une première étape de scellement est réalisée par utilisation d'une colle cyanoacrylate (COLLE PRISM 406 FL 20GR LOCTITE UC12). Ensuite, une colle époxy (Quick Set Epoxy Adhesive RS PRO 850-956) forme une deuxième couche, plus large et recouvrant l'ensemble de l'entaille.

Enfin, du scotch Kapton® (Dupont™) permet la dernière étanchéification. Une fois cette dernière étape effectuée, le flacon est rempli de milieu de culture (30 mL de milieu de culture contenu dans les flacons BACT/ALERT® aérobie FA Plus) puis autoclavé.



Figure 2-11 : Photo d'un flacon de mesure sans scotch Kapton®

La **Figure 2-11** représente un flacon sans scotch (pour visualiser correctement le dispositif) et une plateforme après dépôts d'encres.

Cette méthode a permis de créer des flacons d'hémoculture instrumentés robustes. Le nombre de fuites répertoriées après stérilisation a évolué de 28 % (utilisation de colle époxy seule), à 19 % (colle époxy + colle cyanoacrylate) pour chuter à moins de 8 % (ajout du ponçage et du Kapton®).

3.4. Protocole d'ensemencement et de mesure

Une caractéristique de l'hémoculture, qui est d'ailleurs un défi en milieu hospitalier, est la faible concentration en bactéries dans le sang du patient²⁶. Nous avons cherché à nous comparer le plus possible à la réalité clinique, c'est pourquoi un calcul précis de la quantité de bactéries inoculées a été réalisé à chaque fois.

Les manipulations sont exécutées sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique). Toutes les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence, définies par leur numéro ATCC (*American Type Culture Collection*) ou NCIMB (*National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria*). Ces souches sont des micro-organismes utilisés pour des contrôles d'équipements ou de procédés dans l'industrie et le domaine médical.

Une culture de travail, permettant le prélèvement de colonies en limitant les phénomènes de contamination possible des souches de référence, est réalisée 24 h avant chaque expérience. La plupart du temps, cette culture se fait sur gélose au sang (Columbia 5 % Sheep Blood Petri – VWR), bien que certaines aient été réalisées sur TSA (Tryptic Soy Agar – VWR). La nature de la gélose ne semble pas influencer nos résultats.

Des colonies sont prélevées de cette culture de travail et placées dans 3 mL de diluant pharmaceutique. L'absorbance à 600 nm de cette solution est mesurée. La quantité de colonies prélevées est ajustée afin d'obtenir une absorbance entre 0,8 et 0,12 et qui équivaut à une valeur de 0,5 McFarland mesurée grâce à un densitomètre. Cette valeur de turbidité correspond (valeurs vérifiées expérimentalement) à une concentration bactérienne de :

- $2 \cdot 10^8$ cfu/mL pour des bacilles à Gram négatif ;
- Entre $2 \cdot 10^8$ cfu/mL et $2 \cdot 10^7$ cfu/mL pour les coques à Gram positif ;
- $2 \cdot 10^6$ cfu/mL pour les levures.

Cette concentration étant trop importante pour nos expériences, un protocole de dilution en cascade (**Figure 2-12**) est utilisé pour diminuer la concentration du flacon de prélèvement jusqu'à une valeur cible. Ces dilutions sont réalisées dans du diluant pharmaceutique (Diluant de la pharmacopée européenne – Tube 9 mL – VWR).

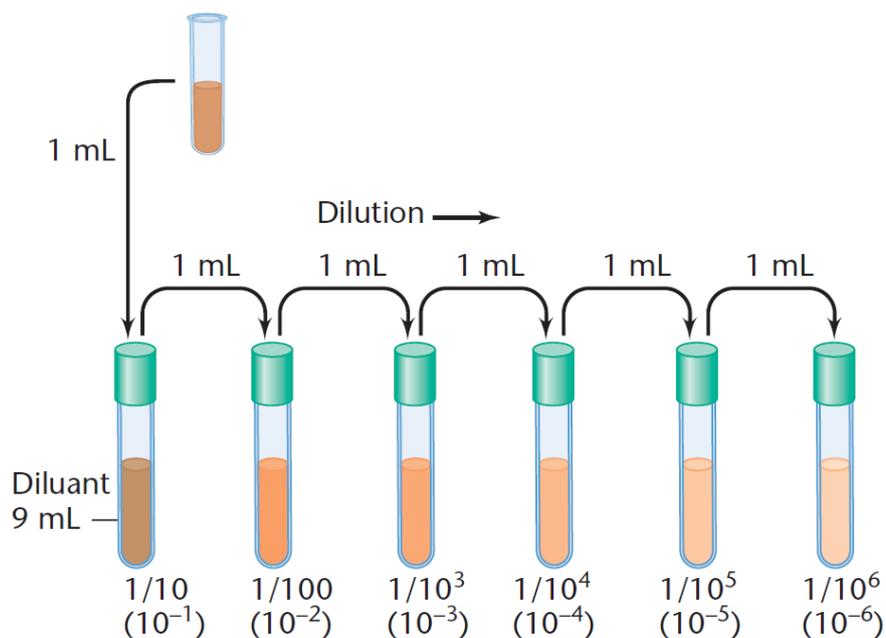


Figure 2-12 : Schéma explicatif de la dilution en cascade (inspiré du livre « Biologie-Des-Micro-Organismes »⁶⁾)

Chaque flacon (instrumenté) est rempli avec 30 mL de milieu de culture BACT/ALERT® aérobie (bioMérieux), puis stérilisé. Après stérilisation, 10 mL de sang sont ajoutés (pour un volume total de liquide de 40 mL). Ce volume correspond au volume préconisé pour les hémocultures.

Suivant l'expérience, du sang de cheval défibriné (SR00050C, Thermo Scientific™) ou du sang humain total (Etablissement Français du Sang) a été utilisé.

L'ensemencement correspond à l'inoculation de 400 μ L d'une suspension bactérienne à la concentration connue, dans le flacon d'hémoculture (ensemencement au $1/100^{\text{ème}}$). Afin de calculer la quantité inoculée, des comptages sur boîtes (en triplicat) sont réalisés.

La quantité de bactéries inoculées dans le flacon est une **moyenne arithmétique**, pas une quantité réelle. Le comptage en triplicat permet d'obtenir un **ordre de grandeur** mais, surtout pour des faibles concentrations, il n'est pas possible de connaître précisément la valeur de l'inoculum (3 cfu peut tout aussi bien correspondre en réalité à 1 cfu ou à 10 cfu).

Le flacon ainsi infecté est placé dans un incubateur

Infors Ecotron, à une température de 37°C, sous agitation à 90 rpm. La plateforme électrochimique est reliée à un multiplexeur, lui-même relié à un potentiostat Autolab PGSTAT128N, contrôlé par le logiciel Nova 2.1. La mesure du potentiel, à l'abandon, de chaque électrode dure 0,1 seconde (donc 0,8 secondes de mesure pour l'ensemble des électrodes) et est répétée toutes les 5 minutes pendant

une période de 20 h à 3 semaines selon l'objectif de l'expérience. Les électrodes de travail sont ainsi la majorité du temps déconnectées, n'impliquant pas de phénomènes de polarisation parasites.

3.5. Utilisation de différentes matrices

Les premières expériences ont d'abord été conduites dans du milieu de culture BACT/ALERT® aérobie seul puis avec du sang de cheval défibriné (SR00050C, Thermo Scientific™) et enfin avec du sang d'origine humaine.

On appelle « BACT/ALERT® aérobie » le milieu de culture présent dans les flacons d'hémoculture BACT/ALERT® FA Plus²⁷, commercialisés par la société bioMérieux, dont la composition exacte est inconnue. Il est à noter que ce milieu est supplémenté en général avec des billes de polymères absorbantes permettant la « neutralisation » des molécules antibiotiques éventuellement présentes dans le sang du patient afin de favoriser la croissance bactérienne au sein du flacon. Ces billes n'ont pas été ajoutées dans les expériences présentées dans ce manuscrit (sauf indication contraire).

Aucune expérience n'a été réalisée dans un milieu anaérobie pour des raisons de complexité de mise en œuvre (remplacement de l'air par de l'azote après stérilisation par autoclave).

Le fibrinogène est une glycoprotéine soluble qui peut devenir de la fibrine, réaction visible lors de la coagulation⁶. Le sang de cheval défibriné est donc du sang total dépourvu de cette protéine.

Une fois la validation du procédé obtenue sur cette matrice, le sang de cheval a été remplacé par du sang humain total, fourni par l'EFS (Etablissement Français du Sang) et possédant les caractéristiques suivantes :

- Un donneur ne produit qu'un seul échantillon de 10 mL de sang ;
- L'héparine est l'anticoagulant utilisé ;
- Le sexe, groupe sanguin et autres données sont connues pour chaque échantillon ;
- Le sang est stérile car il provient de donneurs sains.

L'utilisation de sang humain a permis la création d'une base de données importante, se rapprochant grandement des conditions réelles d'une hémoculture. De plus, un donneur ne pouvant donner qu'un seul flacon de 10 mL, chaque expérience a été réalisée sur un sang unique, ce qui rajoute de la diversité dans nos mesures.

En revanche, le sang utilisé provenant de donneurs sains, les concentrations en anticorps et en globules blancs présents dans nos échantillons ne sont pas représentatives (beaucoup plus faibles) de celles observées chez des patients infectés. De plus, aucune molécule antibiotique n'est présente dans les

sangs utilisés. Cette complexité étant difficilement reproductible en laboratoire, des études cliniques sont nécessaires pour valider l'utilisation du procédé étudié dans cette thèse.

3.6. Choix des micro-organismes à étudier en priorité

Une base de données a été construite sur plusieurs espèces bactériennes lors de ce doctorat (voir **Chapitre 3**). L'application visée étant l'hémoculture, nous avons décidé de nous intéresser principalement à des espèces couramment retrouvées dans ce test microbiologique. Pour des raisons pratiques, une sélection a été opérée en fonction des souches présentes au DTBS.

Les espèces (ou groupement d'espèces) étudiées dans la suite de ce manuscrit sont : les staphylocoques à coagulase-négative, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (notre bactérie modèle), *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* et *Streptococcus pyogenes*.

D'après les informations fournies dans le **Tableau 2-2**, l'ensemble de ces micro-organismes a représenté plus de 87 % des hémocultures aux Etats-Unis en 2002. Nos choix semblent donc pertinents pour évaluer l'intérêt du dispositif développé pendant ce doctorat.

Rank	Bacterial species or group	No. of isolates	% of total no. of isolates
1	Coagulase-negative staphylococci	34,640	42.0
2	<i>S. aureus</i>	13,618	16.5
3	<i>E. faecalis</i>	6,893	8.3
4	<i>E. coli</i>	5,942	7.2
5	<i>K. pneumoniae</i>	2,942	3.6
6	<i>E. faecium</i>	2,873	3.5
7	Viridans group streptococci	2,773	3.4
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,030	2.5
9	<i>S. pneumoniae</i>	1,901	2.3
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,550	1.9
11	<i>Serratia marcescens</i>	814	1.0
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	733	0.9
13	<i>Proteus mirabilis</i>	732	0.9
14	<i>Streptococcus agalactiae</i>	626	0.8
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	470	0.6
16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	376	0.5
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	256	0.3
18	<i>Citrobacter freundii</i>	245	0.3
19	<i>Streptococcus pyogenes</i>	211	0.3
20	<i>Enterococcus avium</i>	153	0.2
21	Others	2,791	3.4
Total	82,569	100	

Tableau 2-2 : Fréquences d'occurrence des espèces ou groupes bactériens isolés à partir d'hémocultures de patients hospitalisés aux États-Unis en 2002 d'après Karlowsky et al²⁸.

Chapitre 3

Détection et identification des bactéries pendant leur croissance

1. Suivi du pH pendant une hémoculture

L'objectif premier de cette thèse a été le développement de capteurs électrochimiques, intégrables dans un flacon, permettant le suivi du pH lors d'une hémoculture.

En effet, à l'instar des travaux sur le *Colorimetric Sensor Array* de Shrestha *et al.*¹ (cf. **Chapitre 1**), un flacon d'hémoculture instrumenté permettant de suivre en temps réel l'évolution de la production de CO₂, à travers l'évolution du pH de la solution, pourrait permettre une détection de la croissance bactérienne, le tout avec un dispositif portable et à bas coûts qui autorise une analyse pendant le transport.

Pour répondre à cette problématique, une électrode de polyaniline, dont la réponse au pH a été montrée dans le **paragraphe 3.2.1 - Chapitre 2**, semble être un capteur pertinent. Ce matériau a déjà été utilisé lors d'un projet collaboratif au DTBS où des encres polyaniline (dont la formulation a été optimisée) ont été testées après stérilisation.

Le dispositif électrochimique utilisé est décrit au **Chapitre 2**. Pour chaque expérience, deux électrodes de travail constituées du même matériau sont utilisées afin d'améliorer la fiabilité et la robustesse de la mesure. Cette précaution permet également d'obtenir plus de données pour les études développées dans ce chapitre tout en préemptant la réalité des phénomènes observés dans un même flacon, au regard des artefacts de mesures ou des dysfonctionnements potentiels.

La bactérie, mise en œuvre en terme de démonstration et largement utilisée pendant cette thèse, est *Escherichia coli*, une entérobactérie à Gram négatif. Elle est en effet la cause la plus répandue de bactériémies dans les pays développés² et sa croissance rapide en fait un modèle pratique pour des expériences qui demandent de nombreux réplicas.

1.1. Mesures électrochimiques avec la polyaniline

La **Figure 3-1** présente les évolutions du potentiel mesuré pour les 2 électrodes de polyaniline dans 2 expériences différentes : une croissance bactérienne (40 cfu d'*Escherichia coli* inoculées à t=0) et un négatif (flacon stérile).

Dans les deux cas, la solution de mesure est un mélange de 10 mL de sang humain et 30 mL de milieu de culture BACT/ALERT® aérobie, placé à 37°C et sous agitation (90 rpm).

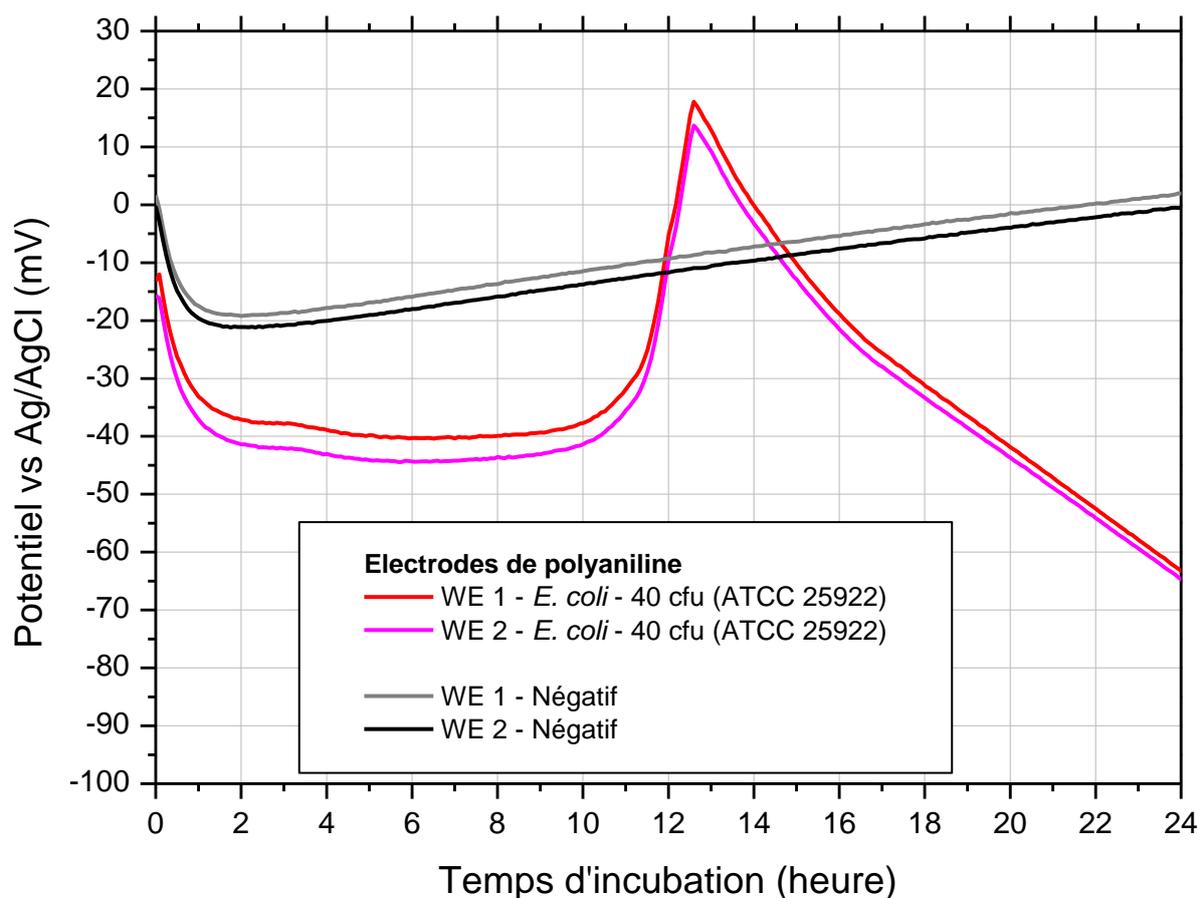


Figure 3-1 : Evolution du potentiel de deux électrodes de polyaniline (WE = Working Electrode), pendant une croissance bactérienne d'*Escherichia coli* (40 cfu à t=0) et pour un flacon stérile (négatif). Hémocultures de sang humain dans le Bact/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Plusieurs conclusions peuvent se dégager de ces expériences. Premièrement, en l'absence de bactérie, le potentiel de la polyaniline semble dériver dans le temps, de manière constante. L'expérience négative a été poursuivie pendant plusieurs jours et sa stérilité a été confirmée. La dérive reste constante, sans variation de potentiel importante (voir **paragraphe 2.1 – Chapitre 3**).

Deuxièmement, les deux premières heures de mesure correspondent à d'importants changements de potentiel. Deux phénomènes peuvent expliquer en majeure partie ces observations.

L'hydratation des électrodes.

C'est un problème qui pourrait se résoudre en hydratant au préalable notre dispositif. Cependant, bien que les flacons autoclavés soient déjà remplis de milieu de culture, ils sont stockés fermés et retournés. Ce mode de stockage a été mis en place pour éviter la dégradation des électrodes : la membrane de polyuréthane sur l'électrode de référence n'étant pas parfaite (dépôt à la main, recouvrement non contrôlé), un stockage dans un milieu liquide pourrait occasionner une migration de l'argent dans le milieu de culture, et donc un flacon inutilisable. Ce mode de stockage, en préservant les électrodes, assure également une bien meilleure reproductibilité des mesures : un enjeu crucial pour la collecte d'une base de données.

L'équilibrage thermique.

Le sang utilisé est stocké à 4°C tandis que les flacons restent à température ambiante, on observe donc nécessairement un temps de latence correspondant à l'équilibrage de la température jusqu'à 37°C. L'équilibrage thermique s'accompagne également d'échanges gazeux entre la phase aqueuse et le volume mort du flacon, la solubilité des gaz dans l'eau diminuant lorsque le flacon revient à température ambiante.

Les 2 à 3 premières heures, bien qu'instables du point de vue du potentiel, ne nous intéressent pas dans notre étude. En effet, il existe un temps de latence pour les micro-organismes, pendant lequel la croissance ne peut être détectée³. Les bactéries s'adaptent au nouvel environnement, et cette adaptation ralentit la survenue de la croissance exponentielle. Ce temps, incompressible, n'est pas une période visée par notre application : la variation du signal électrochimique pendant cette période n'est donc pas un problème à résoudre. Toutefois, il est possible d'expliquer la variation continue du potentiel mesuré par l'adsorption d'espèces biologiques, notamment de protéines, à la surface des électrodes de PANI⁴.

Enfin, la croissance des bactéries (ici *Escherichia coli*) entraîne une augmentation brusque du potentiel suivi d'un pic après 10 h d'incubation. Cette évolution brusque semble correspondre au phénomène recherché, l'acidification du milieu par l'acide carbonique H₂CO₃. En effet, son amplitude est d'environ 60 mV, ce qui correspond à une diminution d'environ 0,94 unité pH compte tenu d'une sensibilité de nos électrodes de polyaniline (calculée au **paragraphe 3.2.1.1 - Chapitre 2**) de -64 mV par unité pH.

Cette brusque augmentation du potentiel est directement corrélée à la mesure de positivité de l'hémoculture (cf. **paragraphe 1.3.2.1 - Chapitre 3**).

En revanche, cette augmentation rapide est immédiatement suivie d'un pic puis d'une décroissance du potentiel, avec une pente plus abrupte (environ 80 mV).

Cette observation semble indiquer : soit une alcalinisation de la solution immédiatement après l'acidification (hypothèse peu probable), soit la détection d'un autre phénomène modifiant le comportement de nos électrodes de PANI en présence de bactéries. Pour expliquer ce phénomène et discriminer le rôle des bactéries et de la PANI dans cette évolution inattendue, la réponse d'un autre matériau sensible au pH a donc été évaluée : l'oxyde d'iridium.

1.2. Mesures électrochimiques avec l'oxyde d'iridium

Le dispositif électrochimique utilisé (voir **paragraphe 3.2 - Chapitre 2**) permet de mesurer le potentiel de 8 électrodes différentes dans chaque flacon.

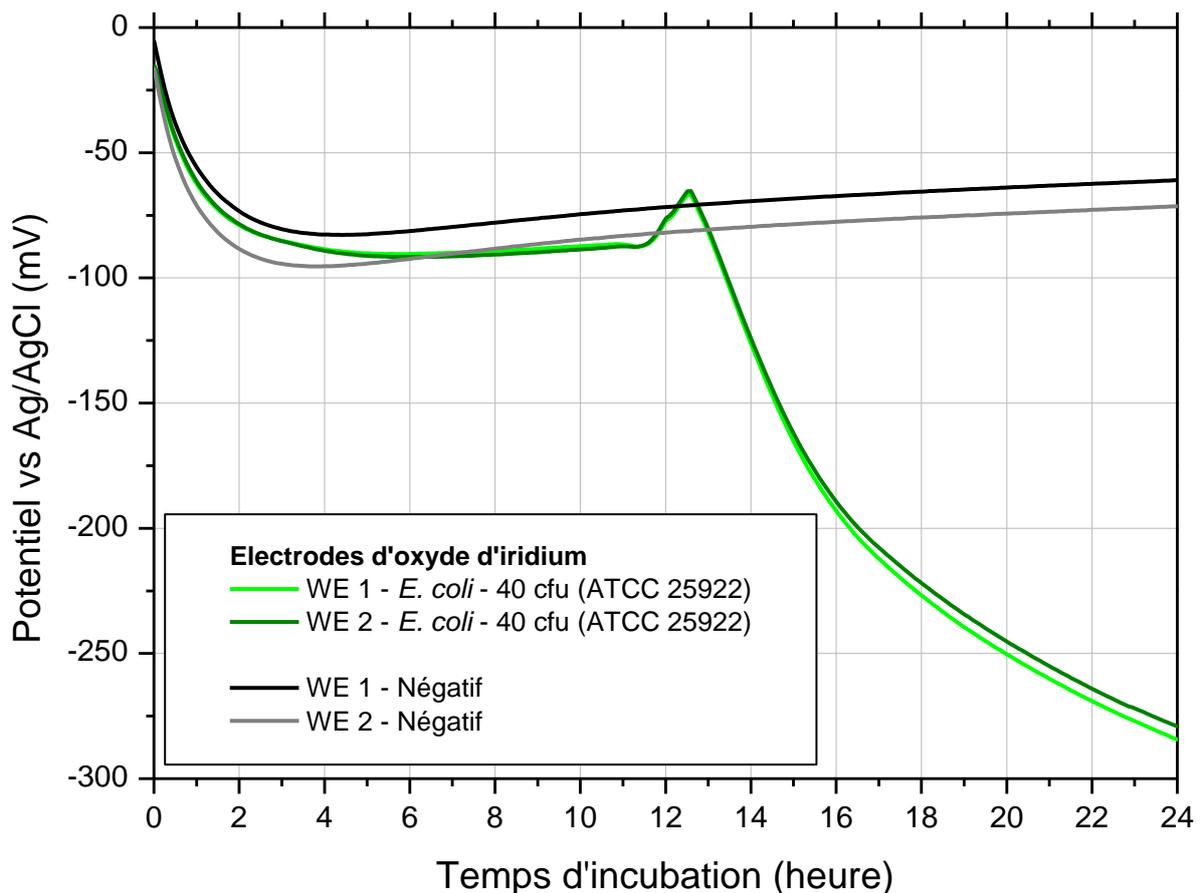


Figure 3-2 : Evolution du potentiel de deux électrodes d'oxyde d'iridium, pendant une croissance bactérienne d'*Escherichia coli* (40 cfu à t=0) et pour un flacon stérile (négatif). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Les courbes présentées en **Figure 3-2** ont donc été obtenues lors de la même expérience et dans les mêmes conditions que les courbes présentées en **Figure 3-1** (40 cfu d'*Escherichia coli* inoculées dans du sang humain à t_0), seul le matériau d'électrode de travail change.

La réponse en potentiel des électrodes d'oxyde d'iridium dans les premiers temps des expériences est macroscopiquement « calquée » sur l'évolution temporelle observée pour les électrodes de polyaniline :

- La dérive temporelle constante du potentiel en l'absence de bactéries ;
- Les variations importantes du signal en début d'expérience.

Après le temps de mesure correspondant à l'expression de la positivité de l'hémoculture, le comportement des électrodes d'IrOx (oxyde d'iridium) est radicalement différent. Un pic de potentiel est bien observé mais l'amplitude d'environ 20 mV correspond à une chute d'environ 0,37 unité pH (sensibilité de l'oxyde d'iridium = -54 mV/pH), une acidification apparente différente de celle enregistrée par la polyaniline, alors même qu'il s'agit de la même hémoculture.

De plus, la chute de potentiel, de plus de 200 mV, qui suit directement le pic semble trop importante pour être reliée uniquement à une variation de pH. En supposant cette éventualité, les électrodes de polyaniline et d'oxyde d'iridium ne détecteraient pas la même alcalinisation du milieu.

Les comportements de ces deux matériaux, sensibles au pH, nous permettent deux affirmations :

- a) Il semble tout à fait envisageable d'utiliser la polyaniline et l'oxyde d'iridium dans un montage potentiométrique pour détecter une croissance bactérienne (dans du sang humain total) ;
- b) Les évolutions de potentiel ne sont pas cohérentes avec les réponses attendues, supposément associées au début de ce travail à une évolution de pH. Ceci semble donc indiquer que l'acidification du milieu de culture n'est pas le seul paramètre physicochimique/microbiologique impactant le potentiel mesuré par nos électrodes.

Afin de comprendre si l'origine des variations de potentiel observées est liée à une acidification ou une alcalinisation du milieu, il paraît nécessaire de relier trois signaux évoluant pendant une hémoculture : le pH, la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon (biomasse) et le potentiel mesuré.

1.3. Corrélation entre pH, biomasse et potentiels

1.3.1. Protocole de l'expérience réalisée

La mesure du pH, en temps réel, peut être effectuée dans un flacon d'hémoculture en immergeant une électrode pH commerciale. Cependant, l'objectif de cette expérience est également de mesurer la biomasse présente dans le milieu, un prélèvement est donc nécessaire. Afin de limiter les risques relatifs à la manipulation d'aiguilles (pour prélever) et de sang d'origine humaine, du sang de cheval défibriné a été utilisé pour cette expérience.

Un flacon d'hémoculture instrumenté avec notre dispositif électrochimique (voir **paragraphe 3.3 - Chapitre 2**) est muni d'un bouchon où un septum a été incorporé au préalable. Le flacon est rempli avec 80 mL, soit deux fois plus de liquide que lors d'une hémoculture standard, afin de permettre l'immersion des électrodes malgré les prélèvements réguliers de solution (**Figure 3-3**). Les proportions restent cependant les mêmes que dans toutes les expériences classiques d'hémoculture : $\frac{1}{4}$ de sang (20 mL) pour $\frac{3}{4}$ de milieu BACT/ALERT® (60 mL).

Le mélange sang/milieu de culture est inoculé par environ 600 cfu d'*Escherichia coli* (ATCC 8739), portant la concentration bactérienne dans le flacon à environ 7,5 cfu/mL au début de la mesure. Cette concentration est légèrement supérieure à celles habituellement observées dans des conditions réelles (environ 1 cfu/mL dans le sang donc 0,25 cfu/mL dans le flacon). Ce choix est justifié par la nécessité de favoriser une croissance très rapide. La culture s'effectue à 37°C sous agitation à 90 rpm.

A intervalles réguliers, 2 mL de milieu sont prélevés. Cette prise d'essai est utilisée de 2 façons :

- Un volume d'1 mL permet une mesure du pH du milieu, mesure effectuée avec une électrode de verre conventionnelle et un pH-mètre (*inoLab™ pH 7310*) ;
- Un volume d'1 mL est dilué en cascades (Diluant pharmacopée – Tube 9 mL – VWR) pour obtenir des solutions à des concentrations utiles pour un comptage après étalement sur boîte de Petri.

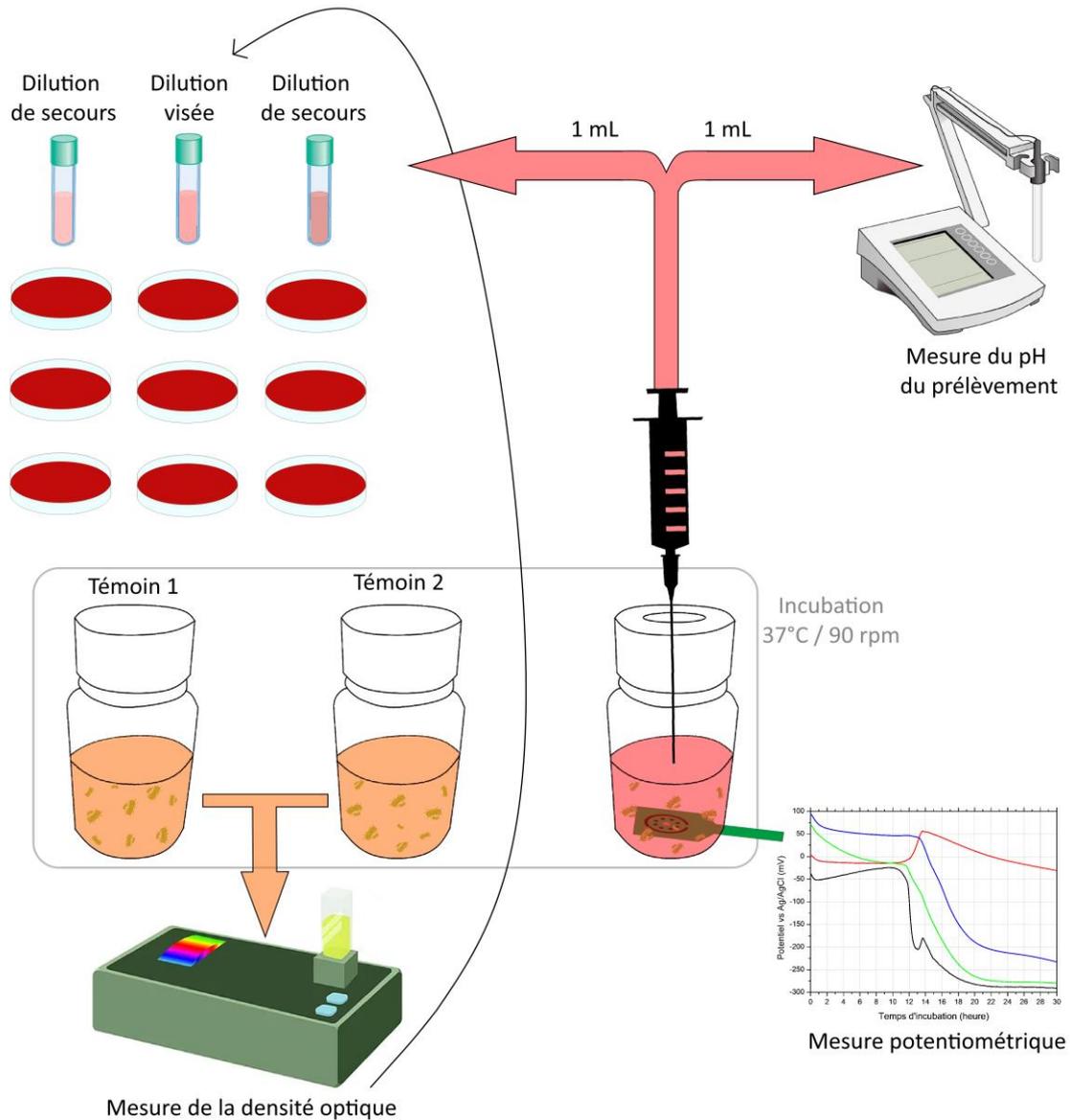


Figure 3-3 : Schéma récapitulatif de l'expérience. Deux flacons témoins, inoculés avec la même biomasse, permettent le suivi de la densité optique en fonction du temps, qui donne une concentration bactérienne approximative (en cfu/mL). Un prélèvement de 2 mL de l'hémoculture est effectué régulièrement toutes les 30 minutes environ : 1 mL pour la mesure de pH, 1 mL pour le comptage de la biomasse. En parallèle, les évolutions de potentiel sont enregistrées pendant toute la période de croissance bactérienne.

Comment évaluer la dilution à effectuer ?

L'évolution de la concentration bactérienne dans l'hémoculture étant inconnue et les comptages ne donnant leur résultat que 24 h plus tard, une méthode pour connaître la dilution requise (pour chaque prélèvement) est nécessaire afin de limiter le nombre de boîtes de Petri à utiliser.

Trois flacons ont été inoculés avec la même concentration bactérienne : le flacon d'hémoculture instrumenté + deux flacons remplis de milieu BACT/ALERT® mais sans sang de cheval. Ces deux derniers flacons ont servi de témoins. Avant chaque prélèvement dans l'hémoculture, une mesure de densité optique à 600 nm (OD_{600}) a été réalisée sur les témoins grâce à un spectrophotomètre (*Varian Cary 300 Scan UV-Visible Spectrophotometer*).

L'évolution de la OD_{600} nous a permis de connaître approximativement la biomasse dans les flacons témoins. Nous avons fait l'hypothèse que la concentration bactérienne était équivalente dans l'hémoculture. Cependant, pour être certains de ne pas rater une dilution (conduisant à des boîtes de comptage sans colonie ou avec trop de colonies pour être comptées), 2 à 3 dilutions ont été étalées pour chaque prélèvement, chacune en triplicat (voir **paragraphe 3.4 - Chapitre 2**).

1.3.2. Résultats et discussion

Au vu des contraintes d'horaires d'ouverture et de fermeture du laboratoire, les évolutions de la concentration bactérienne et du pH dans le flacon d'hémoculture n'ont pas été relevées sur toute la durée de la mesure de potentiel, mais uniquement sur les 12 premières heures d'incubation.

Les perturbations très régulières des conditions de culture dues aux prélèvements – arrêt de l'agitation, ouverture de l'incubateur, diminution du volume de la solution – ont, semble-t-il, entraîné une augmentation du temps de latence de quelques heures. Les courbes potentiométriques enregistrées indiquent une positivité entre 11 h et 12 h post inoculation, ce qui est légèrement plus important que les résultats présentés plus haut sur sang humain.

1.3.2.1. Calcul des limites de détection

On remarque en premier lieu que les profils des potentiels d'électrodes (pour les deux matériaux) sont différents dans cette expérience (**Figure 3-4**) par rapport à ceux observés en **Figure 3-1** et **Figure 3-2**. Certains points d'inflexions diffèrent pour la polyaniline et le pic de potentiel n'est plus présent pour l'oxyde d'iridium. Ces observations indiquent très vraisemblablement une dépendance des réponses potentiométriques au milieu de culture utilisé. L'étude de ce paramètre sera approfondie dans le **Chapitre 4**.

Les courbes présentées en **Figure 3-4** semblent indiquer que l'évolution de potentiel caractéristique d'une positivité est conditionnée à une certaine concentration « seuil » de bactéries au sein du flacon. Pour chaque matériau d'électrode, le calcul précis de cette concentration, mais également du temps de détection, nécessite un critère de positivité.

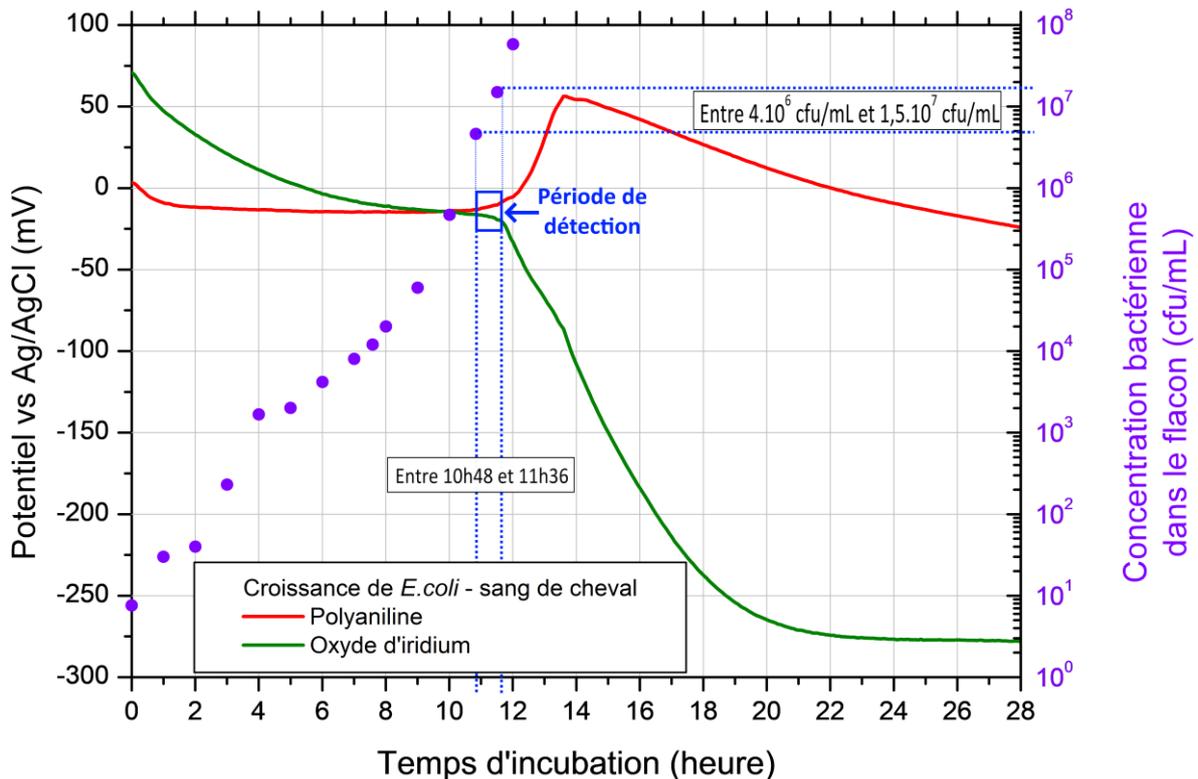


Figure 3-4 : Correspondance potentiel-biomasse pendant la croissance d'*E. coli* (ATCC 8739) dans un mélange BACT/ALERT® FA Plus + sang de cheval défibriné.

Le protocole expérimental choisi entraîne des perturbations du milieu (par le prélèvement régulier de 2 mL de solution), les courbes obtenues en **Figure 3-4** sont donc difficilement comparables à toute autre expérience. Ne disposant pas ni de critère précis de positivité ni de méthode pour en calculer, les valeurs de concentrations « seuils » et de temps de positivité sont des ordres de grandeurs.

Plus loin dans ce chapitre (**paragraphe 4**) une méthode permettant de calculer proprement des temps de positivité a été développée pour des hémocultures dans du sang humain (sans prélèvement).

Comme présenté sur la **Figure 3-4**, une « période de détection » est évaluée visuellement, elle correspond au début de l'augmentation brutale du potentiel de la polyaniline et de la diminution brutale du potentiel de l'oxyde d'iridium.

Cette période de détection s'étale entre 10,8 et 11,6 heures d'incubation. Ces temps sont comparables à ceux trouvés par les automates commerciaux d'hémoculture⁵, ce qui semble indiquer que la potentiométrie détecte un phénomène biologique concomitant à une production de CO₂ importante par les micro-organismes.

Grâce à notre protocole, nous sommes capables de relier ces temps d'incubation à des concentrations bactériennes dans le flacon d'hémoculture. Concernant cette expérience, notre limite de détection semble donc se situer entre 4.10⁶ cfu/mL et 1,5.10⁷ cfu/mL.

Ces valeurs sont beaucoup plus importantes que celles avancées par certaines méthodes électrochimiques de détection de pathogène discutées en **Chapitre 1**, dont les limites de détection peuvent descendre jusqu'à 10^2 cfu/mL⁶.

1.3.2.2. Influence du pH du milieu sur le potentiel des électrodes

Le pH du mélange [BACT/ALERT® + sang de cheval défibriné + bactéries] est remarquablement stable pendant les 10 premières heures d'incubation, malgré la croissance bactérienne. Ce n'est qu'à partir d'une concentration bactérienne d'environ 10^6 cfu/mL dans le flacon que le pH chute, passant de 7,43 à 7,07 en 2 h (**Figure 3-5**). Un tel changement de pH devrait correspondre, dans du PBS, à une augmentation de potentiel d'environ 23 mV pour la polyaniline et 19,4 mV pour l'oxyde d'iridium.

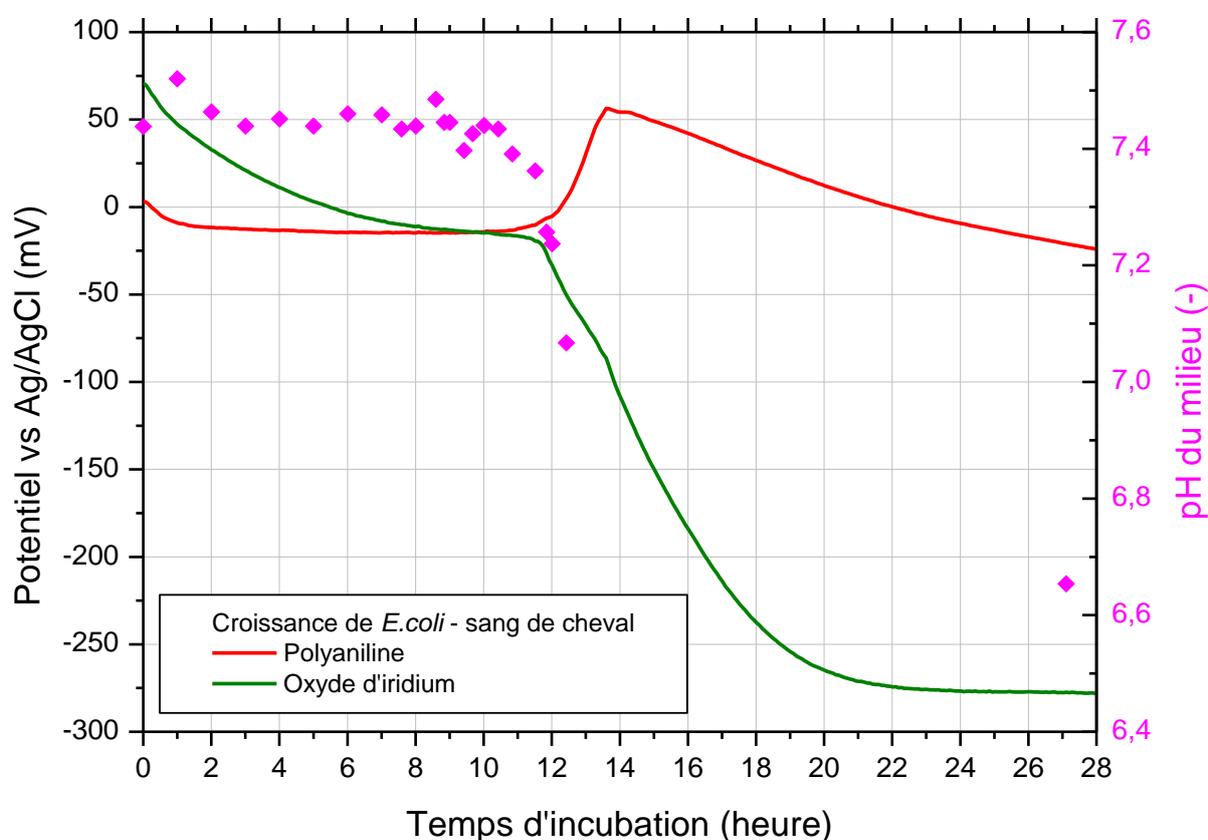


Figure 3-5 : Correspondance potentiel-pH pendant la croissance d'*E. coli* (ATCC 8739) dans un mélange BACT/ALERT® FA Plus + sang de cheval défibriné.

Malheureusement, à cause de contraintes organisationnelles, les prélèvements n'ont pas pu se poursuivre après 12 h d'incubation. Toutefois, une mesure de pH du milieu a pu être effectuée après 27 h d'incubation : le pH a chuté, au total, de 0,8 unités pendant la croissance. Cela devrait correspondre à une augmentation de 51,2 mV pour la polyaniline et 43,2 mV pour l'oxyde d'iridium.

Etude de la polyaniline

Les premières variations de potentiel de la polyaniline semblent correspondre, d'un point de vue temporel, à l'acidification du milieu, mais avec des valeurs plus faibles que celles attendues (environ - 60 mV / unité pH, d'après le **paragraphe 3.2.1.1 - Chapitre 2**) :

$$\begin{aligned} \Delta \text{pH} &= -0,36 \\ \Delta E &= +19 \text{ mV} \end{aligned} \rightarrow \text{Sensibilité polyaniline} \approx -53 \text{ mV / unité pH}$$

Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par la présence d'un recouvrement (*biofouling*) de la surface de notre électrode.

Malheureusement, le pic du potentiel de la polyaniline n'a pas pu être associé à une valeur de pH (mesure pendant la nuit). Il correspond à une augmentation de 70 mV par rapport à la valeur de potentiel pré-acidification, ce qui devrait être associé à une chute de pH d'un peu plus d'une unité. Or, une mesure de pH du milieu a pu être effectuée à 27 heures d'incubation : le pH a chuté au total de 0,8 unité.

La polyaniline aurait donc détecté l'acidification du milieu, conduisant à un pic de potentiel, puis son potentiel a diminué, alors que le pH de la solution est resté stable et acide.

Etude de l'oxyde d'iridium

Le comportement de l'électrode d'oxyde d'iridium est inattendu. En effet, son potentiel chute de 35 mV alors même que l'acidification devrait engendrer une augmentation de 19,4 mV d'après la sensibilité mesurée au **Chapitre 2** ($\Delta \text{pH} * \text{Sensibilité}_{\text{IrOx}} = -0,36 * -54 = 19,44 \text{ mV}$).

Néanmoins, la chute de potentiel de l'oxyde d'iridium semble (étrangement) être corrélée temporellement à la chute du pH observée via l'électrode de verre. Deux hypothèses nous semblent possibles mais sont complexes à confirmer ou infirmer.

Hypothèse 1 : La concentration bactérienne permettant une acidification du milieu est responsable de la sécrétion de molécules redox en quantité suffisante pour entraîner une chute du potentiel de l'électrode d'oxyde d'iridium.

Hypothèse 2 : L'encre carbone, présente dans la formulation de l'encre oxyde d'iridium, entraîne cette chute de potentiel car elle est sensible à des molécules sécrétées par les bactéries. Cette hypothèse pourrait éventuellement expliquer pourquoi l'encre oxyde d'iridium utilisée a une sensibilité pH légèrement inférieure à celle attendue pour un comportement purement Nernstien (- 54 mV/pH au lieu de - 59 mV/pH, voir **paragraphe 3.2.1.3 - Chapitre 2**).

1.3.3. Conclusion

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette expérience :

- a) Notre système de détection repose sur la croissance bactérienne et dépend de la présence d'une quantité importante de micro-organismes dans la solution mesurée.
- b) L'électrode de polyaniline semble détecter la variation de pH en premier lieu, puis un autre processus entre en jeu et entraîne une décroissance du potentiel malgré un pH qui reste acide.
- c) L'électrode d'oxyde d'iridium a un comportement inattendu qui peut s'expliquer par deux hypothèses, l'une basée sur la détection de métabolites redox spécifiques par l'oxyde d'iridium, l'autre par un comportement mixte engendré par l'encre carbone présente dans la formulation de l'encre oxyde d'iridium.

Au vu de ces conclusions, l'étude de matériaux d'électrode différents a semblé indispensable pour avancer dans la compréhension des phénomènes observés par la polyaniline et l'oxyde d'iridium.

1.4. Utilisation de matériaux non sensibles au pH

1.4.1. Mesures électrochimiques avec une encre carbone

Le comportement électrochimique de l'encre contenant l'oxyde d'iridium utilisée pourrait s'expliquer par la présence d'une encre carbone commerciale (BQ242 – DuPont) dans sa formulation. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé cette encre comme matériau d'électrode pour observer son évolution de potentiel, dans du sang humain, en l'absence de bactéries et pendant la croissance d'une *Escherichia coli*.

La **Figure 3-6** représente l'évolution de potentiel de deux électrodes de carbone pour deux expériences différentes (dans un mélange de sang humain et milieu BACT/ALERT®) :

- Une croissance bactérienne à partir de 40 cfu d'*Escherichia coli* inocuées à t=0 ;
- Une absence de croissance (flacon stérile, négatif).

Tout comme pour la polyaniline et l'oxyde d'iridium, la dérive des courbes négatives et les variations importantes en début d'incubation sont visibles. L'encre carbone utilisée ici n'est pas sensible aux variations de pH, pourtant une croissance bactérienne entraîne une chute très importante et rapide (-100 mV en 1 h) du potentiel. On remarque également que la détection, en d'autres termes le décrochage entre un négatif et un positif, est plus précoce avec ce matériau qu'avec la polyaniline ou l'oxyde d'iridium. Enfin, la présence d'un pic de potentiel (visible 2 h après la détection) est à noter, bien que sa cause soit pour le moment non connue.

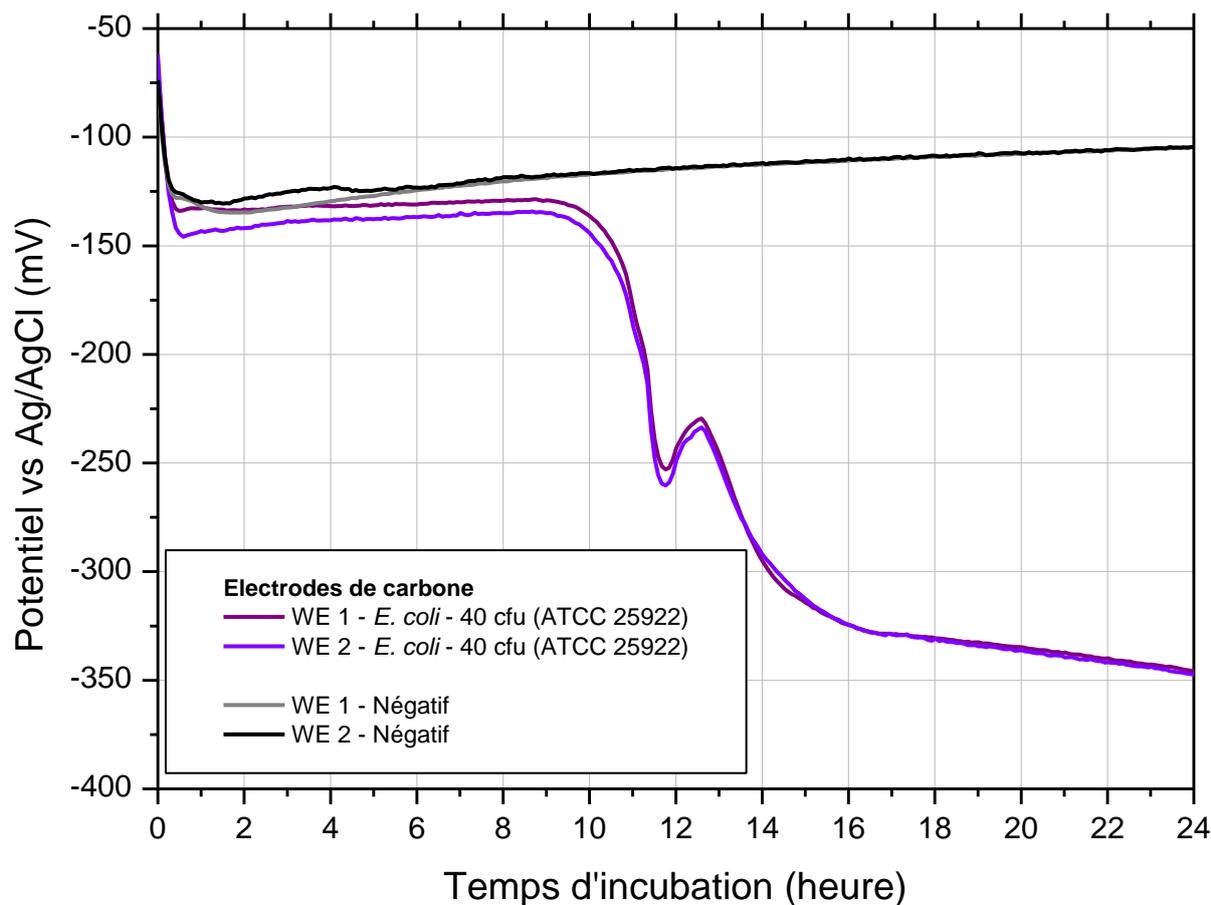


Figure 3-6 : Evolution du potentiel de deux électrodes de carbone, pendant une croissance bactérienne d'*Escherichia coli* (40 cfu à t=0) et pour un flacon stérile (négatif). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Le comportement de l'encre carbone semble donc corroborer deux hypothèses formulées plus haut :

- Des molécules, très probablement des métabolites, ou des édifices biomoléculaires associés à l'enveloppe bactérienne⁷ ayant des propriétés redox, sont détectées par potentiométrie.
- Le potentiel de l'encre carbone seule chute, cette diminution du potentiel est retrouvée en partie dans l'évolution du potentiel de l'encre oxyde d'iridium.

Une croissance bactérienne semble donc être détectable, dans du sang, en observant les réponses potentiométriques, très particulières, de deux matériaux sensibles au pH mais également d'une encre carbone, un matériau utilisé habituellement comme élément conducteur pour une reprise de contact (l'encre BQ242 est également destinée à des applications électrochimiques).

L'hypothèse de la détection de métabolites/biomolécules bactériens ayant une activité oxydo-réductrice nous paraît pertinente au vu des observations réalisées. Pour explorer encore plus en

profondeur cette piste, nous avons décidé d'étudier un dernier matériau, non sensible au pH mais possédant un système redox interne : une encre carbone contenant du bleu de Prusse.

1.4.2. Mesures électrochimiques d'une encre « bleu de Prusse »

Comme expliqué dans le **Chapitre 2**, le bleu de Prusse (de formule $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$), est un médiateur redox couramment utilisé en électrochimie, pour la détection en réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par ampérométrie pour des biocapteurs enzymatiques par exemple. Contrairement à l'encre carbone précédemment étudiée, cette encre comporte un couple redox interne. Le potentiel de l'électrode de l'encre carbone/bleu de Prusse (qu'on notera « encre bleu de Prusse ») n'est donc pas uniquement dépendant des molécules en solution mais également de la réaction de ces molécules avec le $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$.

Les mêmes expériences que précédemment (négatif et croissance d'*E. coli* dans du sang humain) ont été effectuées mais en enregistrant cette fois-ci le potentiel de l'encre bleu de Prusse (**Figure 3-7**).

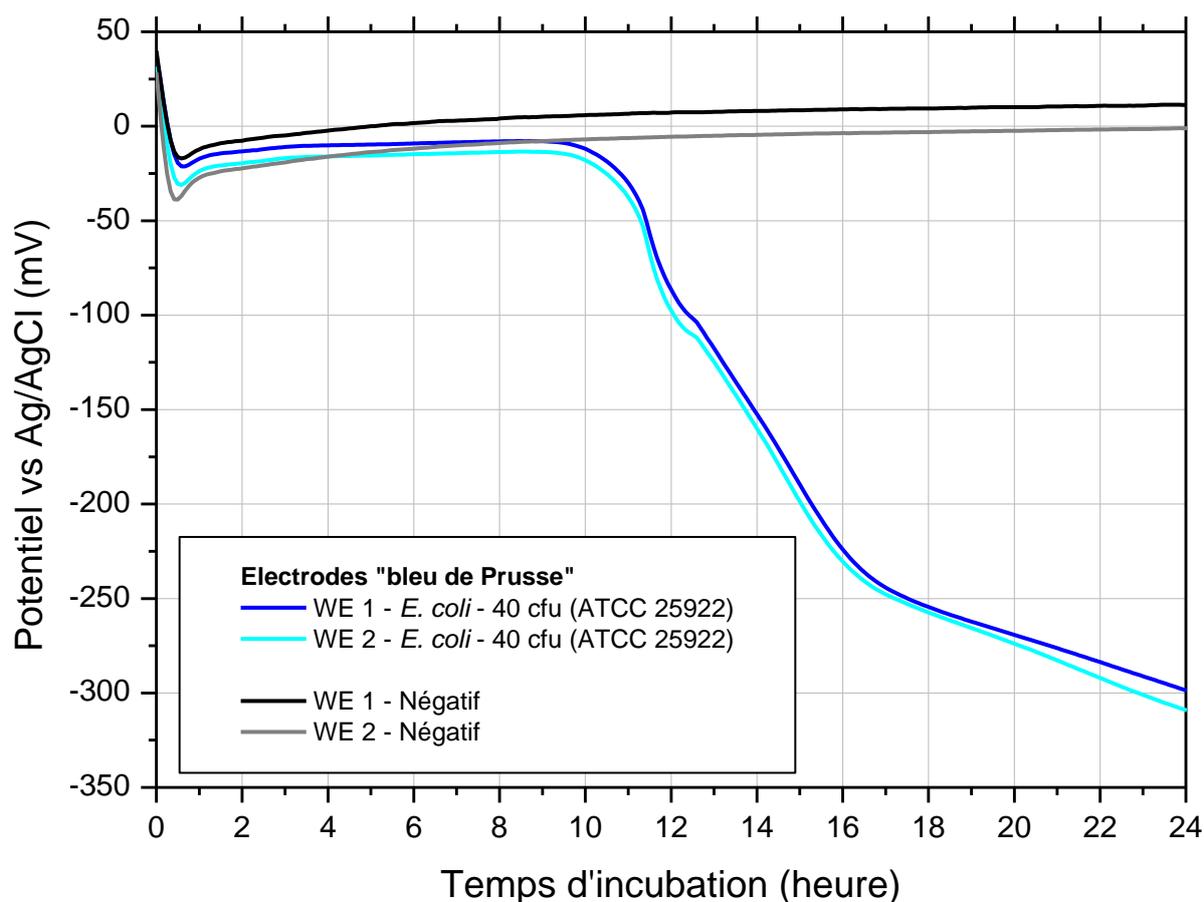


Figure 3-7 : Evolution du potentiel de deux électrodes en encre carbone + bleu de Prusse, pendant une croissance bactérienne d'*Escherichia coli* (40 cfu à t=0) et pour un flacon stérile (négatif). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT FA Plus, 37°C, 90 rpm.

La dérive lente et constante des courbes négatives et les variations de potentiel de début d'incubation ($t < 2$ h) sont des observations partagées pour les 4 matériaux d'électrode testés.

N'étant pas sensible au pH, il n'est pas étonnant de ne pas observer d'augmentation de potentiel avec ce matériau lors d'une croissance bactérienne (40 cfu d'*Escherichia coli* inocuées à t_0). Son comportement est semblable à celui de l'encre carbone seule bien que la chute de potentiel soit légèrement plus lente (environ 2 h pour une perte de 100 mV), ce qui semble assez logique compte tenu de l'existence et des quantités de la sonde redox interne, et qu'aucun point d'inflexion important pendant cette phase d'évolution du signal ne soit visible.

Comme la polyaniline, l'oxyde d'iridium et le carbone, l'encre bleu de Prusse permet donc de détecter une croissance bactérienne par observation de son potentiel au cours du temps. Il est cependant difficile de conclure sur la nature des molécules présentes en solution. Leur production engendre vraisemblablement une chute de potentiel mais, s'agissant d'un milieu de mesure très complexe où des protéines et des cellules sont présentes dans des concentrations élevées, un phénomène de recouvrement de l'électrode par du matériel biologique peut également influencer sur la réponse potentiométrique.

1.5. Hypothèses de travail

L'hypothèse initiale sur laquelle est basé le sujet de cette thèse était la suivante :

La multiplication de bactéries dans un milieu induit une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone et donc d'acide carbonique. Cette chute de pH est visible par suivi du potentiel d'électrodes sensibles au pH.

Pour des électrodes telles que celles en polyaniline et contenant de l'oxyde d'iridium, le profil attendu était donc une croissance puis une stabilisation du potentiel correspondant à une acidification d'une à deux unités pH. Cependant, nous avons pu observer que les profils potentiométriques de ces deux matériaux (**Figure 3-8**) ne peuvent être expliqués de façon simple par les phénomènes sous-jacents à notre hypothèse initiale.

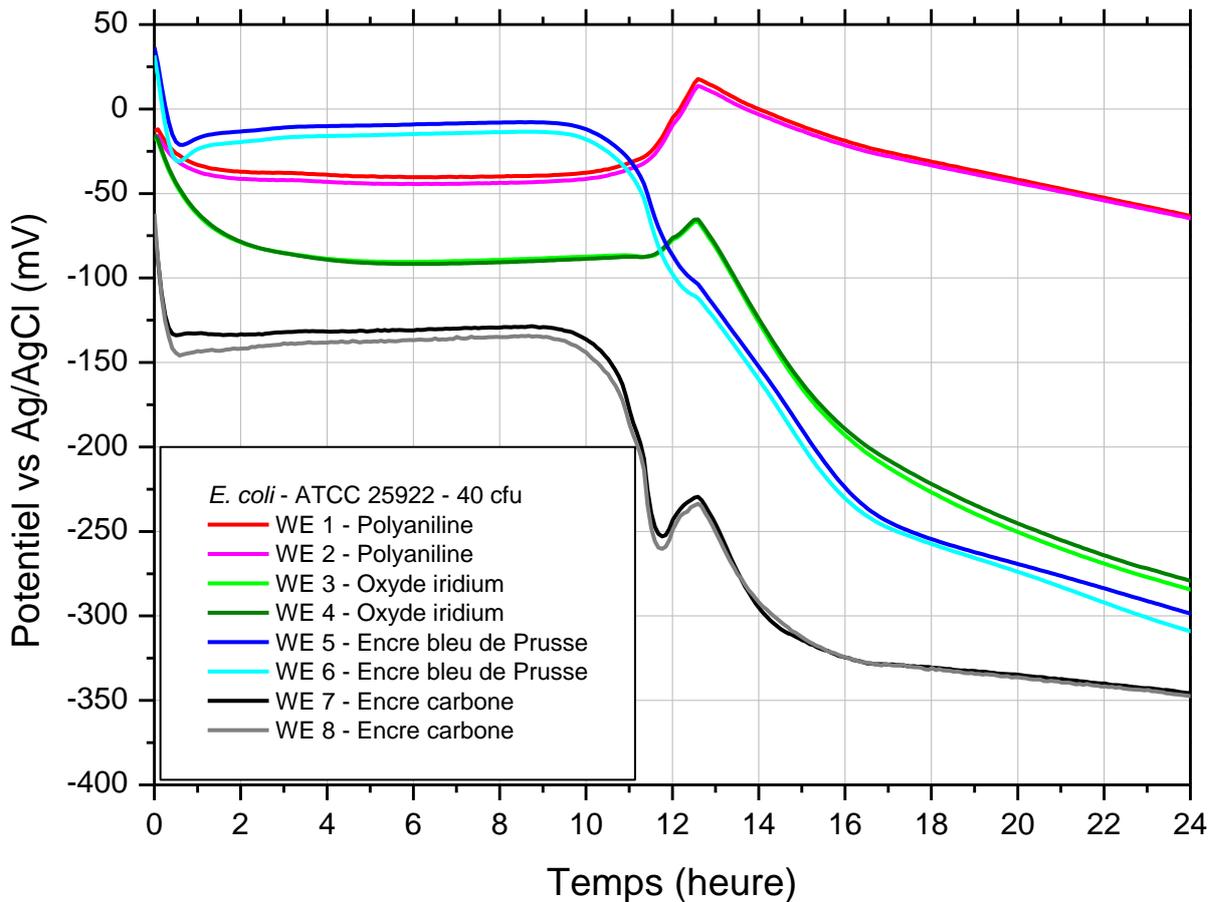


Figure 3-8 : Suivi potentiométrique d'une croissance d'*Escherichia coli* à partir d'un inoculum de 40 cfu à t=0 avec 4 matériaux d'électrodes différents (polyaniline, oxyde d'iridium, encre « bleu de Prusse », encre carbone). Hémocultures de sang humain dans le Bact/ALERT FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Concernant la polyaniline, et dans une moindre mesure l'oxyde d'iridium, une observation similaire à la nôtre a déjà été effectuée et rapportée dans un brevet de Wilkins *et al.*⁸ datant de 1972 (**Figure 3-9**). Leur hypothèse vis-à-vis des évolutions de potentiel enregistrées, entre une électrode de mesure métallique et une électrode de référence au calomel, est la présence d'une « différence de charge électrostatique entre un organisme vivant et l'électrode de mesure ». Toujours d'après ce brevet, cette méthode de détection repose sur la production d'hydrogène par les micro-organismes.

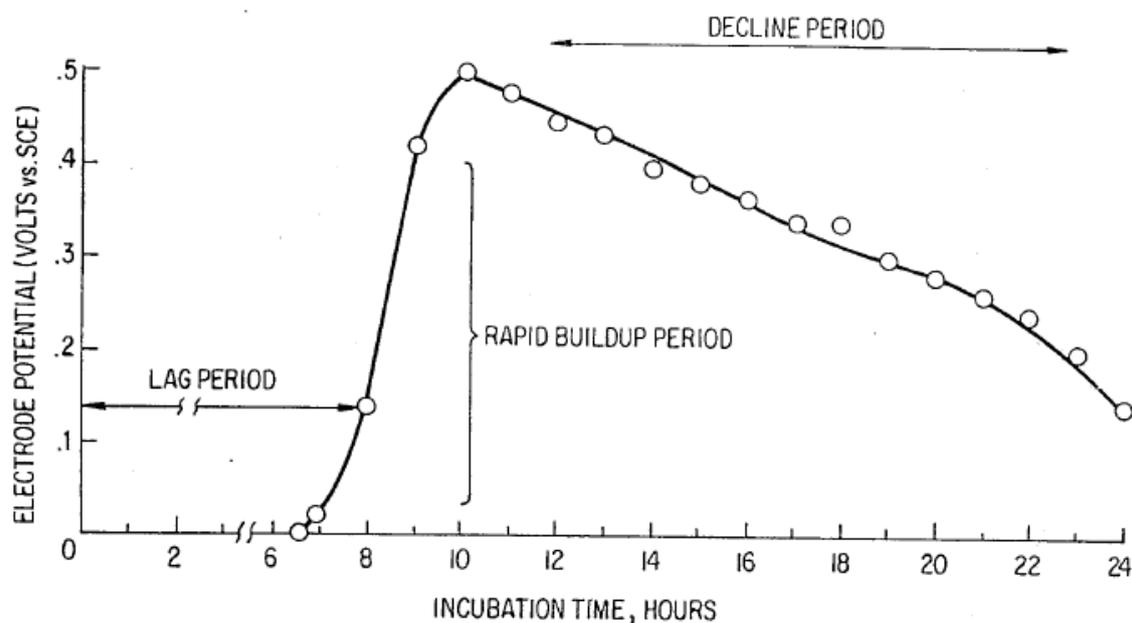


Figure 3-9 : Expérience de Wilkins et Stoner⁸, enregistrement de la différence de potentiel entre une électrode de mesure en platine et une électrode au calomel standard (SCE-Beckman Instruments Inc.) pendant la croissance d'*E. coli* (1,9 cfu/mL à t_0), dans 40 mL de bouillon de culture à 35°C.

Cependant, cette hypothèse d'un dégagement d'hydrogène n'explique pas les évolutions des potentiels des électrodes en carbone et en encre « bleu de Prusse », non sensibles au pH, dans le cas d'une croissance d'*E. coli*. Ces comportements particuliers semblent indiquer la présence de molécules, électroactives, produites par les bactéries durant leur croissance.

La détection serait donc reliée à la présence de métabolites et/ou de biomolécules bactériens électroactifs en plus du dioxyde de carbone.

Notre nouvelle hypothèse est donc la suivante :

Un changement d'équilibre électrochimique, et donc un changement de potentiel, est induit par la production de (bio)molécules électroactives par la bactérie. Ces molécules entraînent une réduction des matériaux d'électrode (= la chute du potentiel) puis un potentiel mixte est atteint.

Les comportements de chaque matériau semblent en effet être en accord avec cette hypothèse :

- **La polyaniline** est d'abord sensible aux variations de pH. Sa réduction est plus longue de par sa structure polymérique 3D, la PANI peut en effet être aussi considérée comme un poly-

électrolyte, les sites redox présents dans le volume du polymère sont donc accessibles mais plus difficilement (diffusion, encombrement stérique, interactions électrostatiques...).

- **L'oxyde d'iridium** est également sensible aux variations pH mais les particules d'iridium présentes à la surface de l'électrode sont rapidement réduites. Les potentiels observés pendant la croissance bactérienne sont effectivement cohérents avec la gamme de potentiel permettant de réduire l'oxyde d'iridium dans le PBS et *in vivo*⁹ (Figure 3-10). On retrouve ensuite le comportement de l'encre carbone après quelques heures.

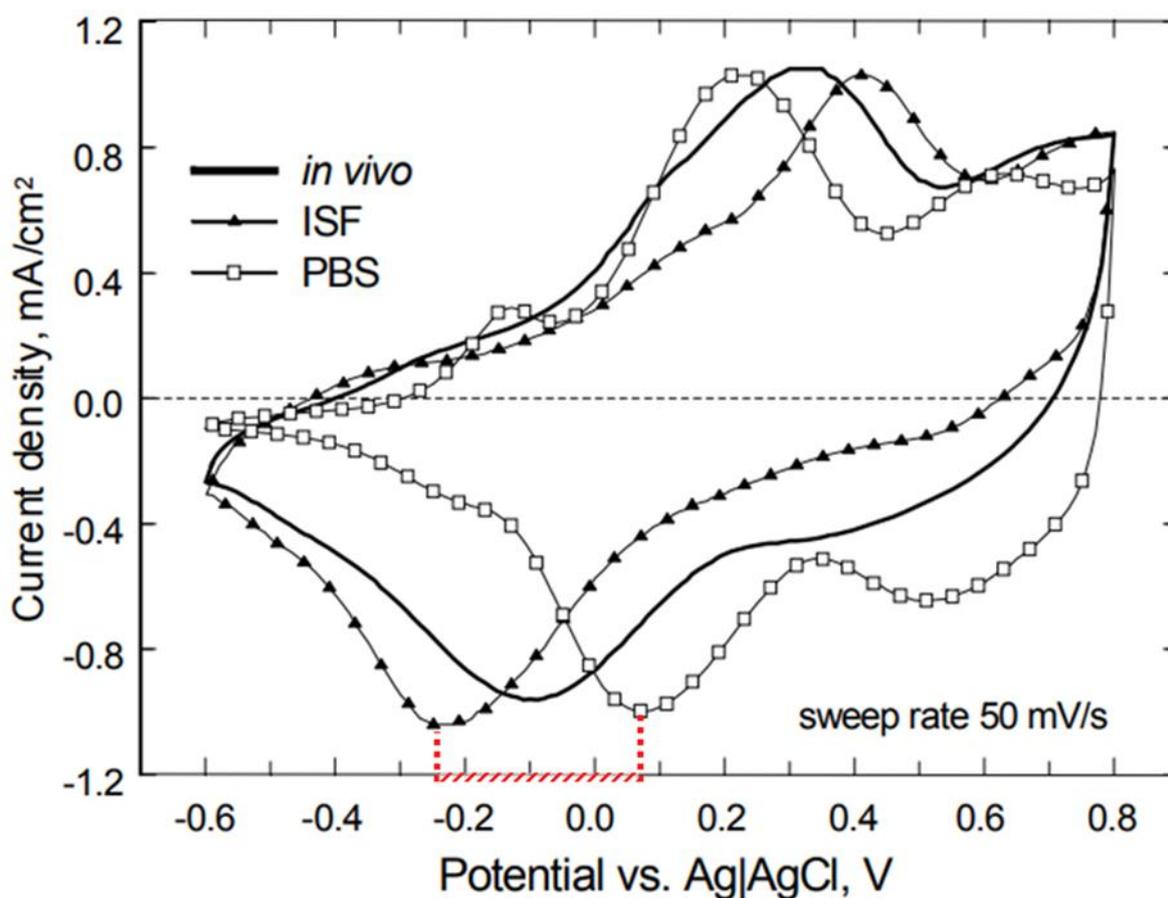


Figure 3-10 : Différences *in vivo* et *in vitro* dans l'injection de charge et les propriétés électrochimiques des électrodes d'oxyde d'iridium d'après une étude de Stuart Cogan⁹. Les pics de réduction se situent entre +70 mV et -250 mV vs Ag/AgCl. (ISF : fluide interstitiel | Sweep rate : vitesse de balayage en potentiel).

- **Le carbone** permet d'observer directement le potentiel mixte associé aux espèces générées par la bactérie, à cela s'ajoute probablement un recouvrement de l'électrode par du matériel biologique.

- **L'encre « bleu de Prusse »** possède un comportement très proche de celui de l'encre carbone, ne révélant pas de dynamique particulière associée au système redox interne de ce matériau.

La validité de cette hypothèse sera discutée dans le **Chapitre 4**. Il est à noter que des analyses par voltampérométries cycliques, non réalisées pendant cette thèse, auraient été pertinentes pour la compréhension des réactions électrochimiques mises en jeu.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de la détection électrochimique de la croissance bactérienne : comment la quantifier, quels temps de détection sont envisageables, pour quels micro-organismes... Notre premier sujet d'étude est donc focalisé sur l'extension de la méthode de détection à d'autres bactéries et sur son exploitation à des fins de diagnostic plutôt qu'à la compréhension des mécanismes chimiques et physiologiques permettant sa réalisation.

2. Suivi et détection d'une hémoculture positive

Afin de pouvoir se comparer aux méthodes existantes dans le domaine de l'hémoculture, il est nécessaire de pouvoir calculer les temps de détection obtenus par mesure potentiométrique, pour chaque matériau d'électrode, et idéalement pour plusieurs espèces bactériennes.

2.1. Evolution des potentiels en l'absence de bactérie

Nous avons débuté cette partie par l'étude des signaux enregistrés en l'absence de croissance bactérienne. Les dérives (éventuelles) de potentiel observées en l'absence de bactérie sont utilisées comme ligne de base de notre système, correspondant à l'absence de détection.

La **Figure 3-11** représente les évolutions de potentiel pour les 4 matériaux, sur 8 électrodes, dans un mélange de 10 mL de sang humain et 30 mL de BACT/ALERT® aérobie, à 37°C, sous agitation (90 rpm) pendant 5 jours (120 h).

En laboratoire, un diagnostic négatif correspond à une absence de positivité du flacon d'hémoculture pendant 5 jours, c'est pourquoi nous avons étendu le suivi de ces signaux pendant ce laps de temps.

Comme observé précédemment dans ce chapitre, deux électrodes composées d'un même matériau possèdent le même comportement. Ceci confirme une certaine reproductibilité des dépôts effectués et des résultats mesurés, malgré des méthodes de production des électrodes et du flacon instrumenté manuelles.

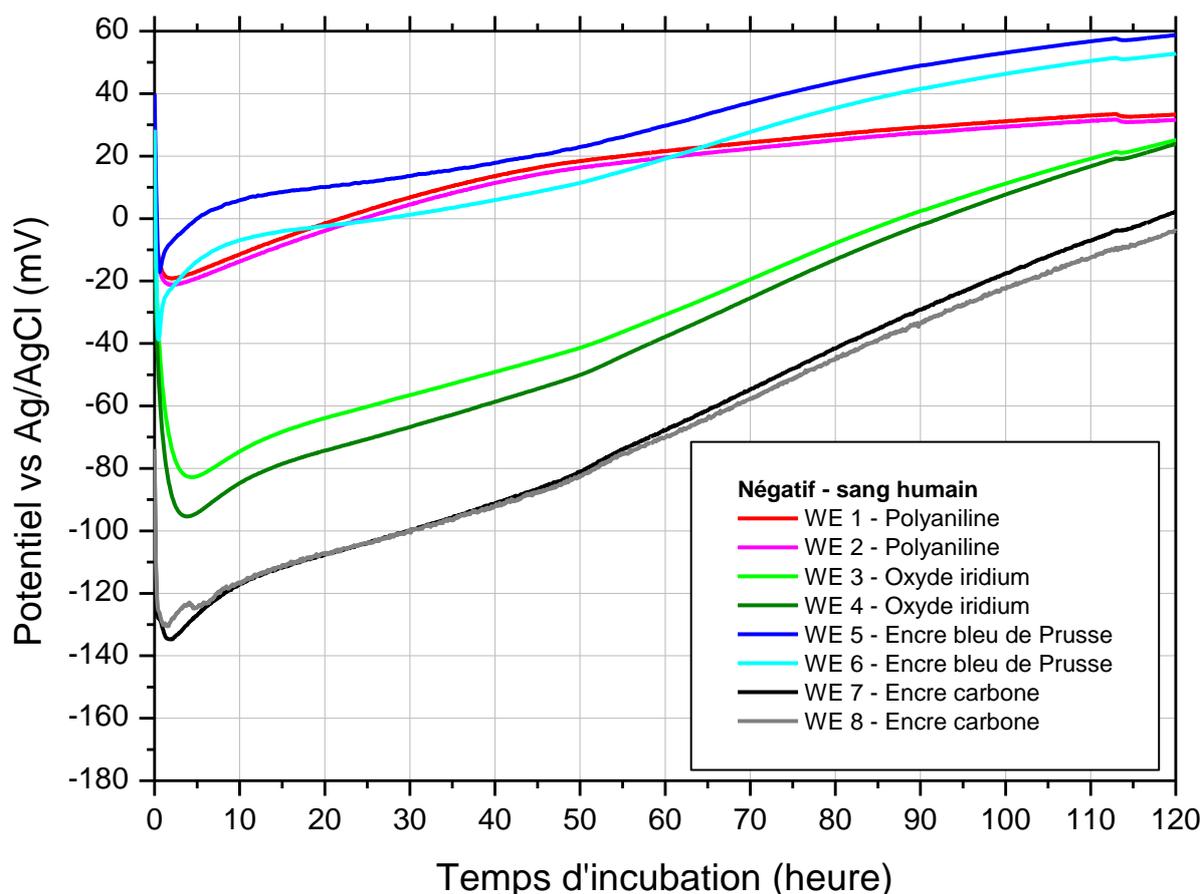


Figure 3-11 : Courbes potentiométriques obtenues pour une expérience dite négative, pendant 5 jours. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Pendant 5 jours, le potentiel de chaque matériau augmente, de manière plus ou moins constante. Les différences de potentiel semblent correspondre à moins d'une unité pH pour la polyaniline (≈ 50 mV pour une sensibilité d'environ 80 mV / unité pH) et environ deux unités pH pour l'oxyde d'iridium (≈ 110 mV pour une sensibilité d'environ 59 mV / unité pH).

En revanche, l'encre « bleu de Prusse » et l'encre carbone présentent également une augmentation, malgré une absence de sensibilité pH. Une acidification de la solution n'est donc pas le seul mécanisme observé.

En analysant l'évolution de potentiel des électrodes de polyaniline pour la même expérience mais effectuée dans un milieu sans cellule sanguine, il s'avère que la même dérive de potentiel est observée (**Figure 3-12**). Ce comportement semble donc traduire l'évolution des matériaux d'électrodes dans le milieu de culture et non pas une oxydation des cellules sanguines (conduisant petit à petit à leur lyse) due au stockage à 4°C des échantillons¹⁰⁻¹³.

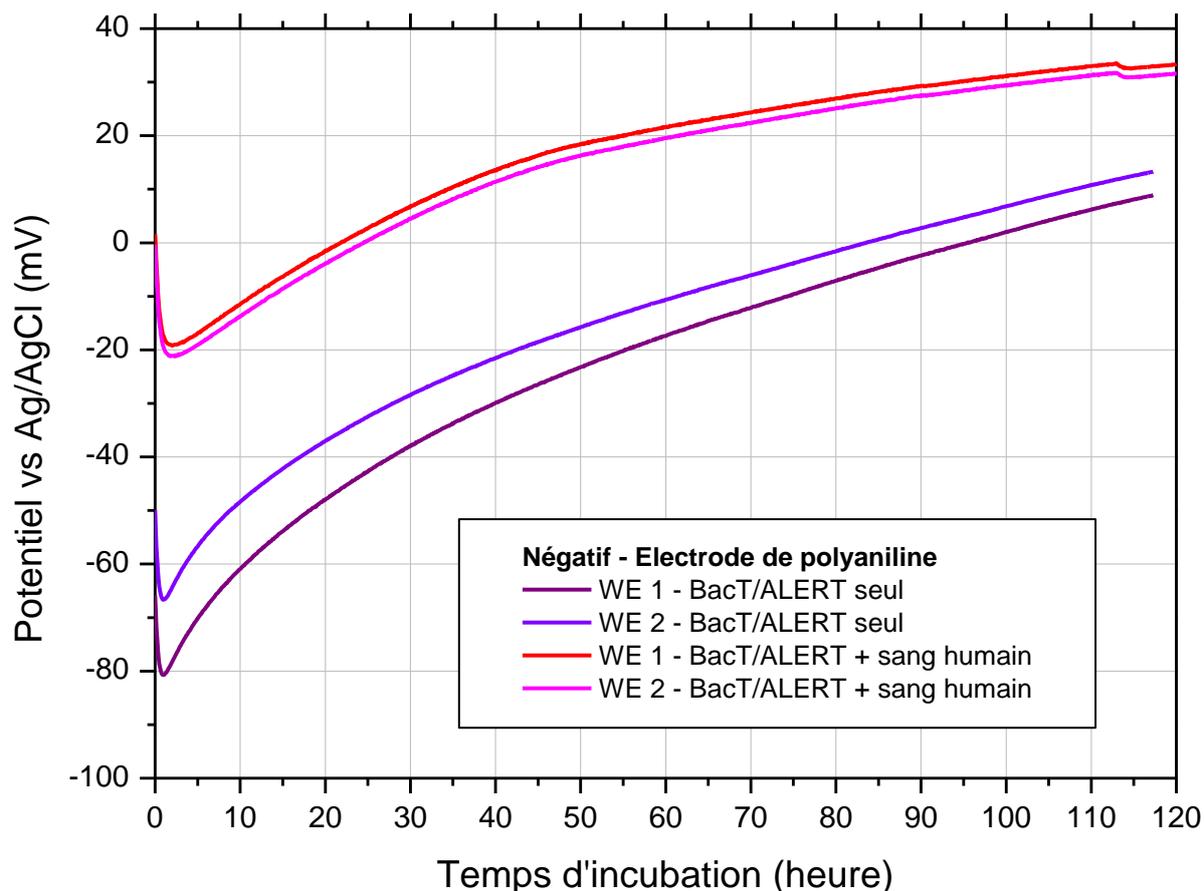


Figure 3-12 : Courbes potentiométriques des électrodes de polyaniline, obtenues pour deux expériences négatives dans deux milieux différents, pendant 5 jours. Milieu 1 = BacT/ALERT® FA Plus. Milieu 2 = Hémoculture de sang humain dans du BacT/ALERT® FA Plus. Incubation à 37°C, 90 rpm.

Des négatifs ont été effectués à plusieurs reprises, l'un d'entre eux a permis de confirmer cette « stabilité » pendant 3 semaines de mesure (**Annexe I**). Des décalages de potentiel sont visibles entre électrodes du même matériau, lors d'une expérience donnée mais également lors d'expériences différentes, rendant les calculs de seuil de détection pour des valeurs de potentiels fixes difficiles, voire impossibles.

2.2. Utilisation de la dérivée du potentiel

Dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes particulièrement intéressés aux électrodes de polyaniline. Ce matériau a été choisi pour illustrer la majeure partie des résultats mais les 4 matériaux d'électrodes présentés précédemment ont été étudiés pendant ma thèse.

La **Figure 3-13** représente les réponses potentiométriques de deux électrodes de polyaniline pour 3 expériences (donc 3 dispositifs différents) associées à 2 croissances d'*E. coli* et un négatif.

Comme nous pouvons le remarquer, d'importantes différences de potentiel sont visibles dès le début de l'incubation, bien que toutes les électrodes soient conçues avec la même encre.

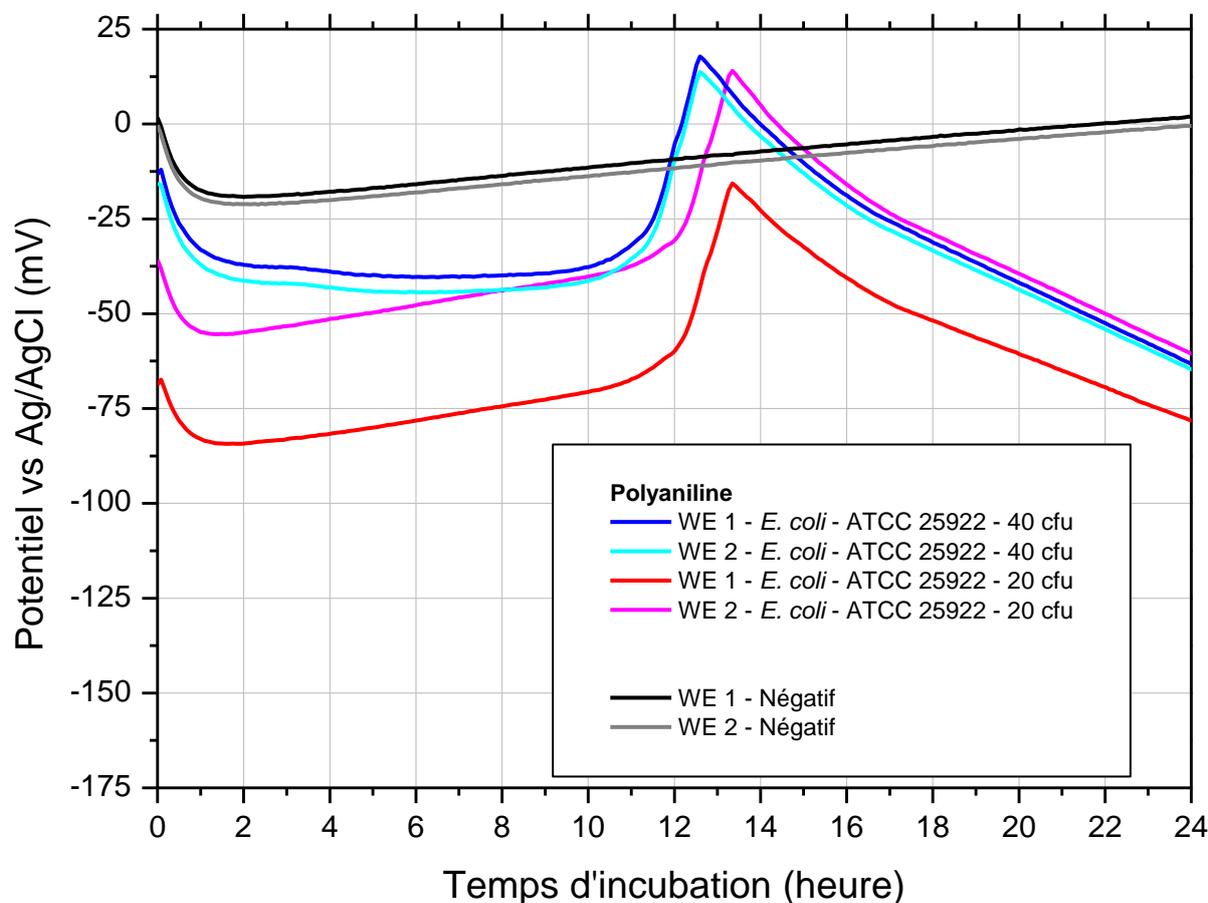


Figure 3-13 : Courbes potentiométriques des électrodes en polyaniline pour deux détections d'*E. coli* et un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Ces variations peuvent s'expliquer par la méthode manuelle de dépôt (épaisseur d'encre non maîtrisée), par la connectique mais également par la variabilité du milieu de mesure. En effet, dans le cas du sang humain, chaque expérience est réalisée dans un sang provenant d'un patient unique, le milieu change donc entre chaque hémoculture. On mime ainsi la réalité de la pratique analytique.

Afin de calculer des limites de détection, une solution a été trouvée pour s'affranchir à la fois des différences de potentiel à $t=0$ et de la dérive lente du potentiel pendant une hémoculture négative : la méthode de détection développée ici repose sur un changement inhabituel et important de potentiel. Un tel type de changement sera caractérisé par une modification brutale de la pente de la courbe de potentiel.

Nous avons donc choisi de ne pas observer le signal potentiométrique mais sa pente, ce qui revient à tracer sa dérivée en fonction du temps. Cette dérivée est ensuite lissée, en calculant la moyenne des valeurs sur 5 points glissants, afin de s'affranchir d'un éventuel bruit de mesure pouvant entraîner aléatoirement de grandes modifications de pente.

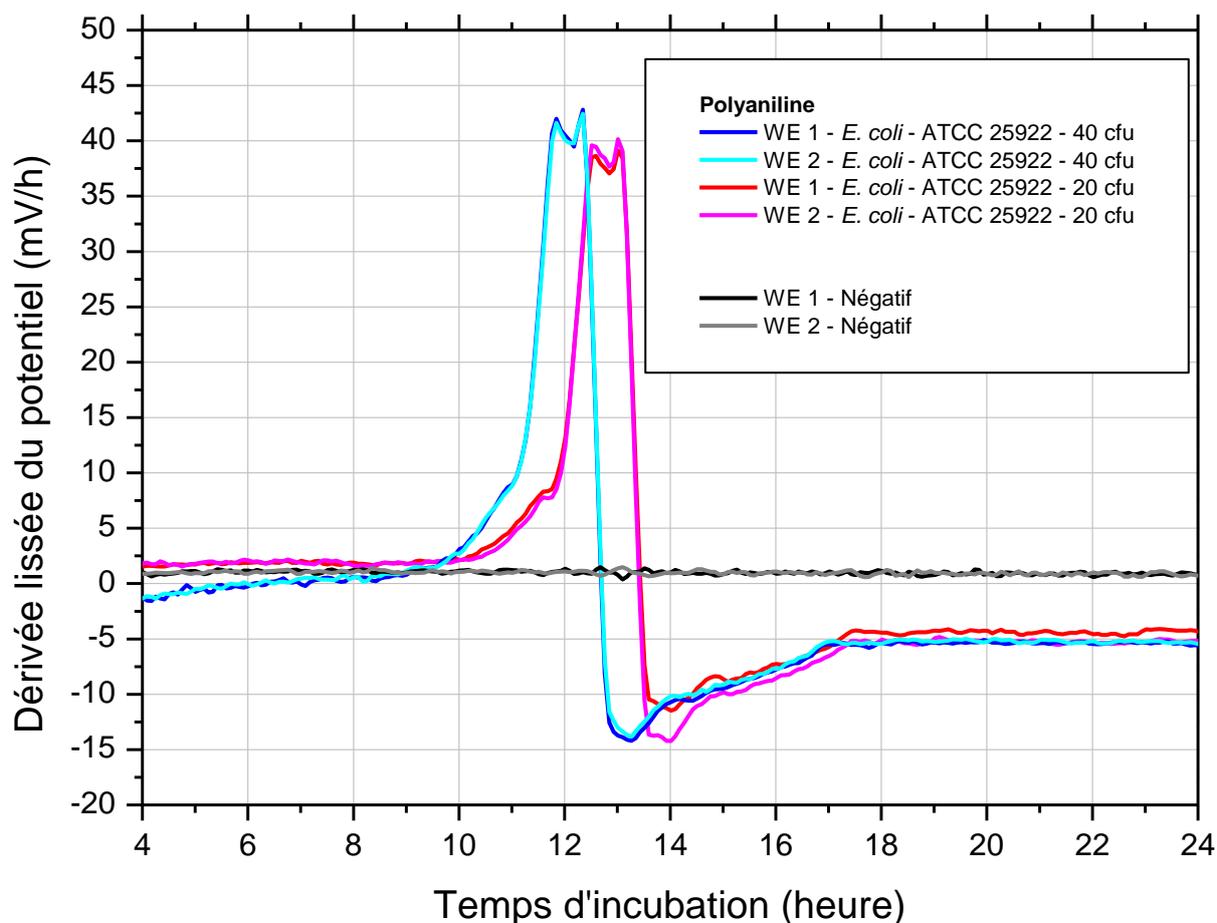


Figure 3-14 : Dérivée lissée du potentiel des électrodes en polyaniline pour deux détections d'*E. coli* et un négatif. Les importantes différences de pentes permettent une détection rapide et visuelle. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

On écarte également, volontairement, les points enregistrés pendant les 4 premières heures d'incubation : cela correspond à un temps pendant lequel le potentiel des électrodes n'est pas stable (voir **paragraphe 1.1 - Chapitre 3**) et pendant lequel aucun automate d'hémoculture, même le plus performant, n'a pu détecter une croissance bactérienne⁵ (aucune détection en dessous de 8 h d'incubation).

La **Figure 3-14** représente les mêmes courbes que la **Figure 3-13** mais exprimées en dérivée lissée de potentiel. On remarque que grâce à ce traitement de données simple, la positivité d'une hémoculture, détectée par électrochimie, est beaucoup plus facile à observer et à quantifier.

La dérivée du potentiel, à partir de 4 h d'incubation, est donc le type de courbes qui seront présentées dans la suite de ce manuscrit.

2.3. Etude de la réponse de la polyaniline pour une croissance d'*E. coli*

A ce stade du travail expérimental, un dispositif de mesure fiable a été développé. Il permet d'observer, via une mesure potentiométrique, une hémoculture négative pendant 5 jours et une hémoculture positive avec *Escherichia coli*. De plus, à l'aide d'un traitement de données particulièrement simple, le temps de détection d'une hémoculture positive est mesurable.

Nous avons donc voulu tester les limites de notre système et ses performances. Tout d'abord en faisant varier la quantité de bactéries inoculée en début d'expérience, puis en testant d'autres souches d'*Escherichia coli*.

Afin de simplifier les graphiques présentés, seules les courbes obtenues avec les électrodes de polyaniline, dans un mélange sang humain + BACT/ALERT®, seront présentées. Néanmoins, chaque expérience a bien été réalisée avec 4 matériaux (sur 8 électrodes), permettant l'acquisition d'un grand nombre de données, utilisées dans le **paragraphe 5 – Chapitre 3**.

2.3.1. Influence de l'inoculum

Une répétabilité parfaite pour les expériences d'hémoculture n'est pas possible puisque chaque expérience est effectuée avec des sangs provenant de patients différents. De plus, la fabrication des électrodes étant manuelle, il n'est pas possible de concevoir 2 dispositifs parfaitement identiques. Enfin, un inoculum ne peut être reproduit exactement, étant donné que les valeurs calculées ne sont que des ordres de grandeurs (voir **paragraphe 3.4 - Chapitre 2**).

C'est pourquoi la « répétabilité » de nos courbes n'est en réalité vérifiable qu'avec des expériences mettant en jeu la croissance d'une même souche bactérienne, en l'occurrence la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922, dans le même type de matrice sanguine, ici du sang humain total.

La **Figure 3-15** permet d'observer la croissance de trois inoculums différents d'*E. coli* ainsi que des courbes négatives avec des électrodes de polyaniline. On peut déduire de ce graphique plusieurs conclusions.

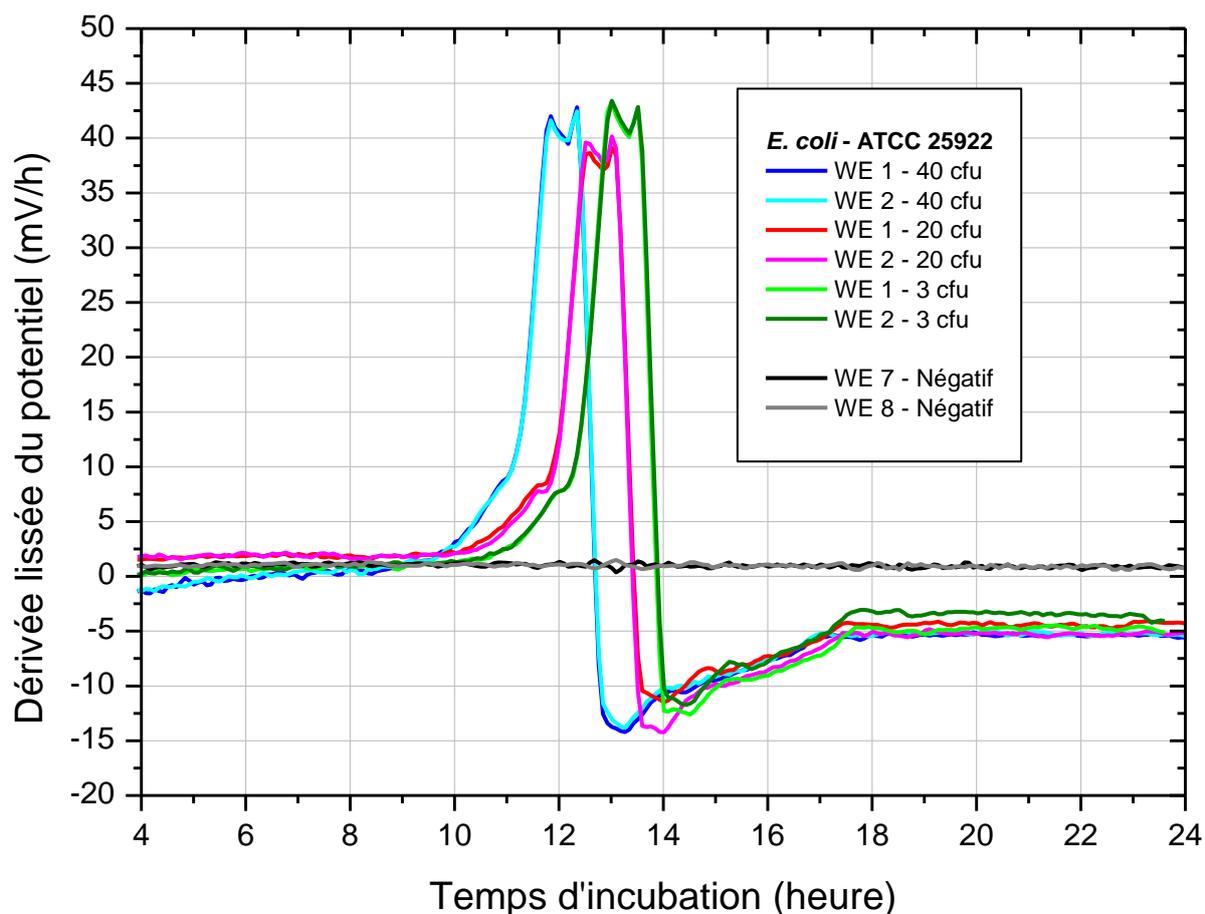


Figure 3-15 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour trois inoculum différents d'*E. coli* (ATCC 25922) et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

En premier lieu, comme observé plus haut dans ce chapitre, deux électrodes composées d'un même matériau semblent présenter des réponses (en termes de dérivée de potentiel) quasiment identiques. Nos dépôts intra-dispositifs semblent donc reproductibles, et il n'existe pas de variabilité spatiale de la réponse électrochimique, du point de vue de la localisation des électrodes sur la plateforme. On affichera donc une seule courbe par matériau pour les prochaines figures.

Ensuite, plus l'inoculum est important, plus le temps de détection est faible. Pour observer cette évolution, un critère de positivité a été nécessaire : on considère qu'une courbe est positive si la dérivée lissée du potentiel (pour la polyaniline) devient supérieure à 7 mV/h. Cette valeur a été choisie d'après l'ensemble des expériences réalisées pendant mon doctorat, elle permet d'éviter les faux positifs et faux négatifs.

Comme montré en **Figure 3-16** pour deux souches différentes d'*Escherichia coli*, une augmentation de l'inoculum de départ entraîne une détection plus précoce. Grâce à ces données, il est également possible de calculer le temps de doublement de la bactérie.

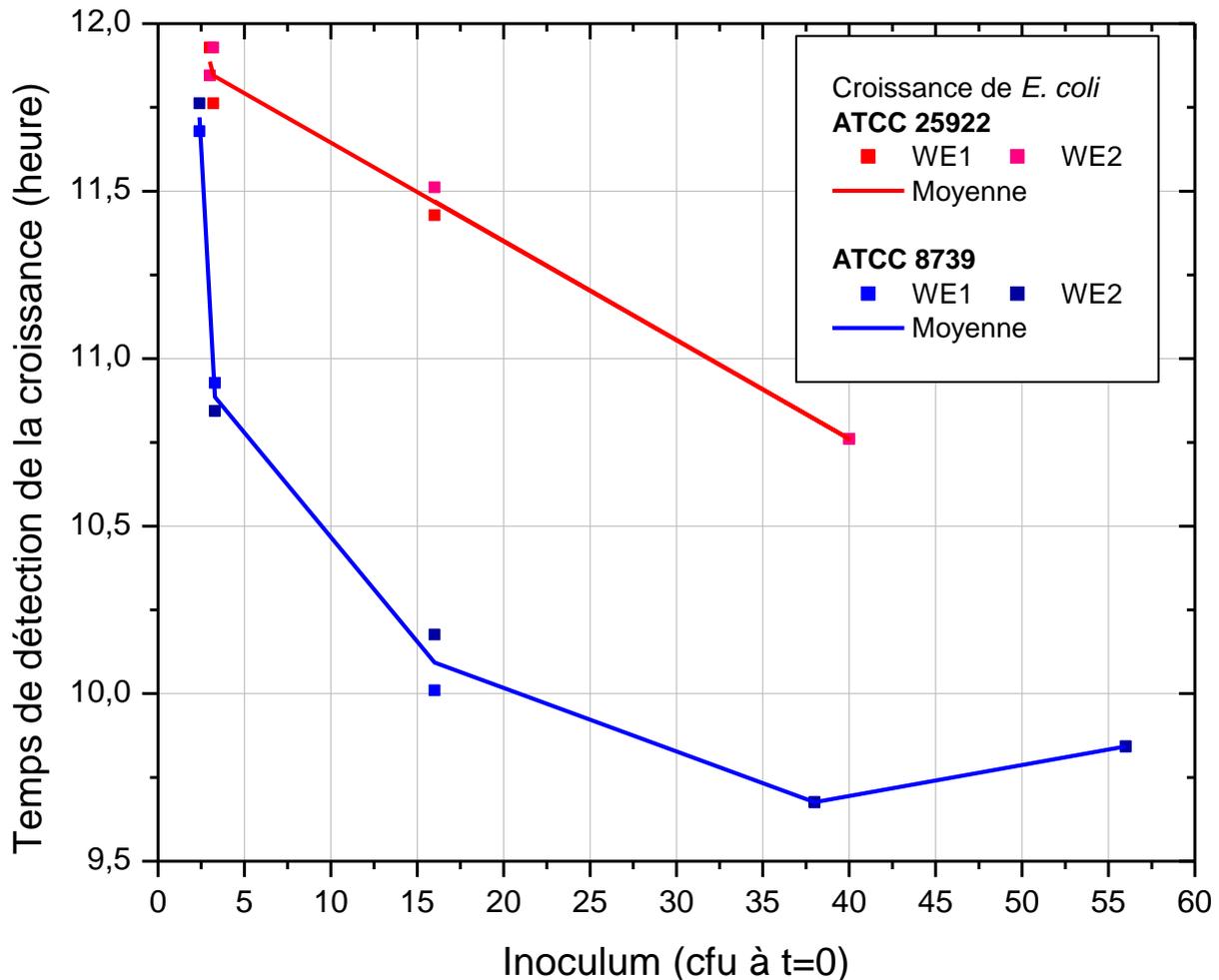


Figure 3-16 : Temps de détection (par électrode et en moyenne) calculés avec la dérivée lissée du potentiel de la polyaniline, pour deux souches d'*Escherichia coli* et plusieurs inoculums. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Calcul du temps de doublement de la bactérie *E. coli* (ATCC 25922) à partir de nos données.

Une diminution de l'inoculum d'un facteur 13 (de 40 cfu à 3 cfu) correspond à une augmentation du temps de détection de 1,1 h (10,8 h à 11,9 h). Comme montré précédemment en **Figure 3-4**, la détection a lieu pendant la phase exponentielle de la croissance des micro-organismes. L'évolution de la biomasse, notée $N(t)$, suit donc une loi exponentielle pendant cette période.

Nous pouvons donc relier la différence de temps de détection à une différence de l'inoculum de départ et calculer le temps de doublement.

Loi de croissance $N(t) = N_0 \cdot e^{rt}$

On sait que $N(1,1) = N_0 * 13 = N_0 \cdot e^{r*1.1}$

Donc $r = \frac{\ln(13)}{1,1}$

On peut donc connaître le temps de doublement de la bactérie :

$$N(t_{\text{doublement}}) = N_0 * 2 = N_0 \cdot e^{r \cdot t_{\text{doublement}}}$$

Donc
$$t_{\text{doublement}} = \frac{\ln(2) \cdot 1,1}{\ln(13)} \approx \mathbf{18 \text{ minutes}}$$

Cette observation est donc en accord avec nos attentes et la littérature : une plus grande quantité de bactéries au début de l'incubation atteindra plus rapidement une croissance exponentielle, ce décalage en temps semble de plus correspondre au temps de doublement connu d'*Escherichia coli* (environ 20 minutes en laboratoire¹⁴). C'est pourquoi la faible concentration bactérienne dans le sang de patients atteints de bactériémies est si problématique concernant le temps de détection¹⁵.

Enfin, les profils des dérivées de potentiel des trois expériences sont remarquablement similaires malgré des expériences effectuées dans des flacons différents, avec des dispositifs différents, des épaisseurs d'encres différentes, des sangs différents et des inoculums différents.

Les profils de dérivées de potentiel associés à la croissance d'une souche bactérienne semblent très robustes. Il n'est donc pas nécessaire d'avoir des inoculums similaires pour comparer deux expériences en termes de profils de dérivée, ce qui confirme l'intérêt d'étudier la dérivée du potentiel comme « signature » caractéristique d'une espèce. Cette signature se doit en effet d'être indépendante de l'inoculum, qui n'est pas connu lors d'une hémoculture en conditions réelles.

L'influence de l'inoculum nous apporte donc beaucoup d'informations, mais la plus remarquable est celle du profil caractéristique de la dérivée. Nous nous sommes donc demandés si ce profil était universel ou s'il était propre à cette souche d'*Escherichia coli*.

2.3.2. Détection de souches différentes

Nous en avons testé trois souches pour l'espèce *Escherichia coli* : ATCC 25922, ATCC 35421 et ATCC 8739. La souche de référence ATCC 11775 n'a pas été étudiée pour des raisons pratiques : elle est labélisée comme une bactérie de classe BSL-2 (*BioSafety Level 2*) et le début du travail expérimental de cette thèse s'est déroulé en laboratoire BSL-1. Quand du sang humain a été utilisé, nous avons conservé les souches déjà testées la première année, sans en rajouter pour les espèces déjà étudiées comme *Escherichia coli*.

Plusieurs inoculums ont permis de s'assurer de la reproductibilité de chaque profil de dérivée lissée (sur 5 points glissants), profils présentés en **Figure 3-17**. Des différences de profils potentiométriques inter-souches sont observées.

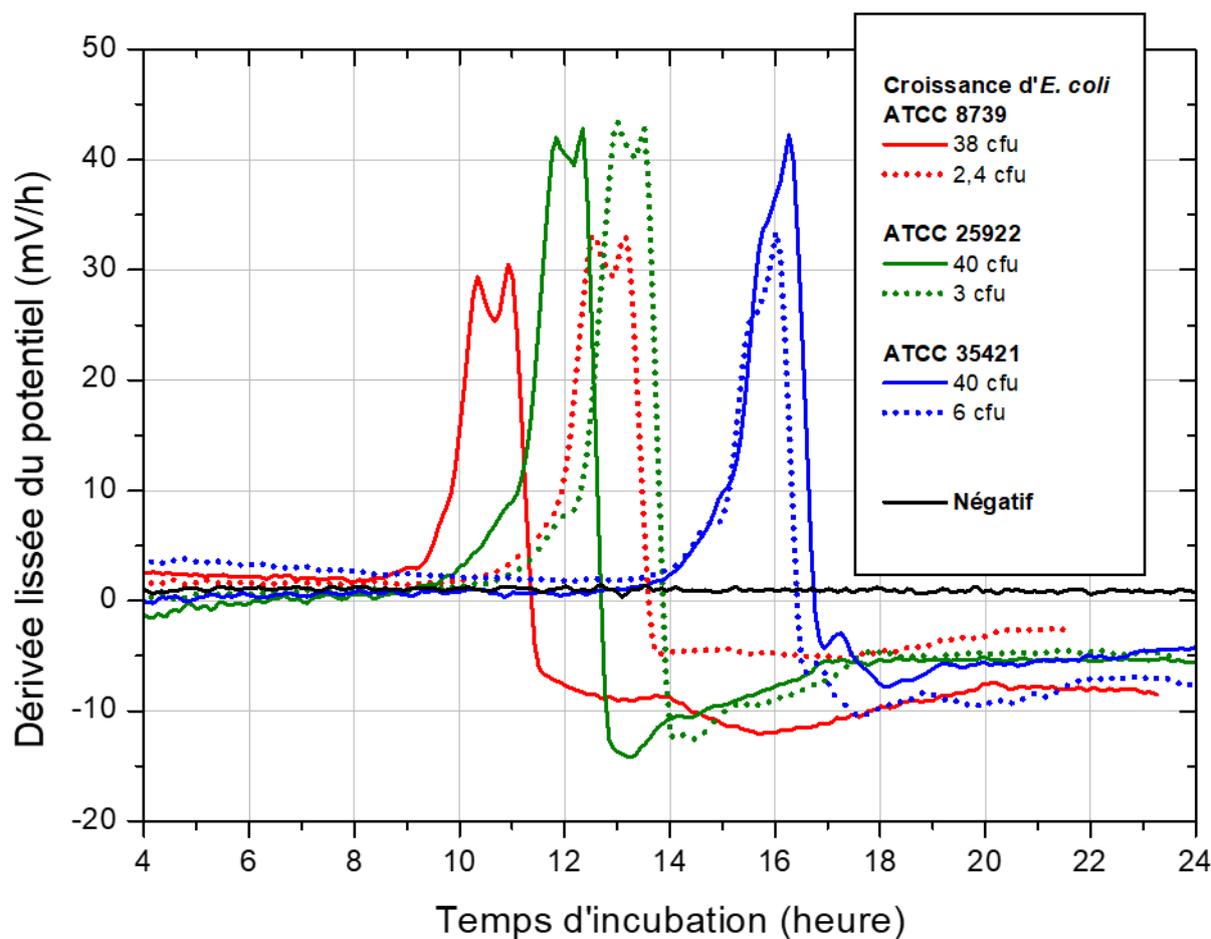


Figure 3-17 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour trois souches de référence d'*E. coli* (ATCC 25922) et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

La dérivée lissée du potentiel de la polyaniline pour une croissance d'*E. coli* dans du sang humain est tout d'abord stable et proche de 0, puis augmente jusqu'à une valeur de plusieurs dizaines de mV/h avant de chuter et de se stabiliser à une valeur autour de -6 mV/h.

Plusieurs caractéristiques de ces profils électrochimiques sont intéressantes :

- Deux pics au sommet de la signature, avec un premier pic moins prononcé dans le cas de la souche ATCC 35421 ;
- Un léger épaulement autour de 8 mV/h, en début de signature, qui est moins visible pour la souche ATCC 8789 ;
- Une forme de stabilisation de la dérivée légèrement différente pour chaque souche :
 - Décroissance puis stabilisation (ATCC 8739) ;
 - Passage par un minimum puis croissance puis stabilisation (ATCC 25922) ;
 - Légère augmentation puis stabilisation (ATCC 35421).

Bien que nous n'ayons testé que trois souches d'une même espèce, les courbes présentées en **Figure 3-17** semblent indiquer une certaine reproductibilité du profil général de la dérivée lissée du potentiel de la polyaniline pour une croissance d'*E. coli* dans du sang humain : croissance puis signature avec 1 ou 2 pics reconnaissables, puis décroissance suivie d'une stabilisation en quelques heures. L'objectif était donc ensuite d'évaluer la technique de mesure sur différentes espèces bactériennes.

3. Base de données sur plusieurs espèces bactériennes

La complexification de notre base de données est présentée de manière progressive, en ajoutant des espèces bactériennes de plus en plus éloignées, phylogénétiquement, de la bactérie de référence *Escherichia coli*. Sur chaque figure, une seule courbe (par espèce microbienne) a été affichée pour représenter le profil général de la dérivée du potentiel d'une électrode de polyaniline (profil confirmé par la deuxième électrode de PANI ainsi que des expériences de reproductibilité).

3.1. Les bactéries à Gram négatif

3.1.1. Les entérobactéries

Les *Enterobacterales* constituent un ordre de bacilles à Gram négatif et à oxydase négative, dont fait partie *E. coli*. Grâce à notre dispositif, nous avons pu détecter la croissance de plusieurs espèces d'*Enterobacterales* : *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* (**Figure 3-18**).

Pour l'ensemble des bactéries testées, les dérivées du potentiel de la polyaniline présentent des similitudes (l'ensemble des profils obtenus pour différentes hémocultures d'*Escherichia coli* est consultable dans l'**Annexe II**) :

- La détection se fait par une croissance de la dérivée ;
- Après un pic, le signal décroît pour devenir négatif ;
- Le prolongement de l'incubation semble se traduire par une stabilisation de la dérivée à une valeur se situant entre -5 et -10 mV/h.

Néanmoins, chaque espèce (et probablement chaque souche) possède des points d'inflexions particuliers au début de la croissance, au niveau du pic et avant stabilisation de la dérivée.

On remarque également que *Citrobacter freundii* se détache des autres bactéries via cette méthode d'identification alors même que cette espèce est proche phylogénétiquement d'*Escherichia coli*¹⁶.

La classification phylogénétique est réalisée entre les séquences codantes du gène pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) d'une bactérie de référence et d'une bactérie à classifier¹⁷. Notre méthode, la détection électrochimique de métabolites bactériens, est donc très différente de celle de la taxonomie ce qui explique les différences visibles sur la **Figure 3-18** alors même que les bactéries détectées appartiennent au même ordre.

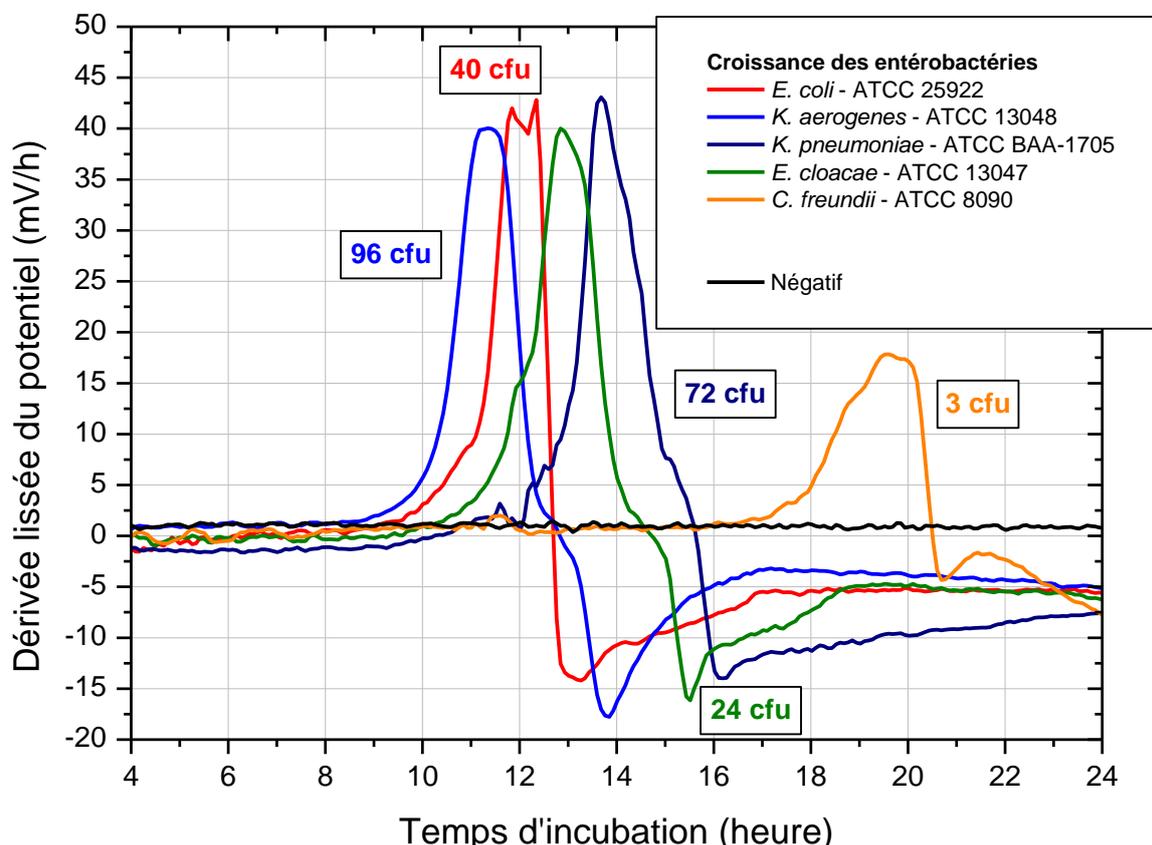


Figure 3-18 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour cinq espèces d'*Enterobacterales* et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm. *E. coli* a été testée 12 fois, *K. aerogenes* a été testée 5 fois, *K. pneumoniae* a été testée 2 fois, *E. cloacae* a été testée 4 fois, *C. freundii* a été testée 3 fois.

3.1.2. Les autres bactéries à Gram négatif

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont deux bactéries pathogènes à Gram négatif particulièrement étudiées dans la littérature. En effet, elles font toutes les deux parties du groupe **ESKAPE**, rassemblant six pathogènes dont la virulence et la résistance aux antibiotiques sont croissantes¹⁸. Un nouveau dispositif d'hémoculture comme celui présenté dans ce manuscrit doit donc nécessairement détecter ce type de micro-organisme.

La **Figure 3-19** représente l'ensemble des espèces bactériennes à Gram négatif testées jusqu'à présent avec notre dispositif, avec un surlignage sur les deux nouvelles bactéries testées. On remarque que les

croissances de *P. aeruginosa* et *A. baumannii* dans du sang humain engendrent des signatures potentiométriques, de la polyaniline, très différentes des entérobactéries.

La dérivée du potentiel chute, le potentiel de la polyaniline décroît donc également. Il est donc possible que la croissance de *P. aeruginosa* et *A. baumannii* entraîne une augmentation du pH du milieu de culture, malgré la production de dioxyde de carbone et donc une carbonatation.

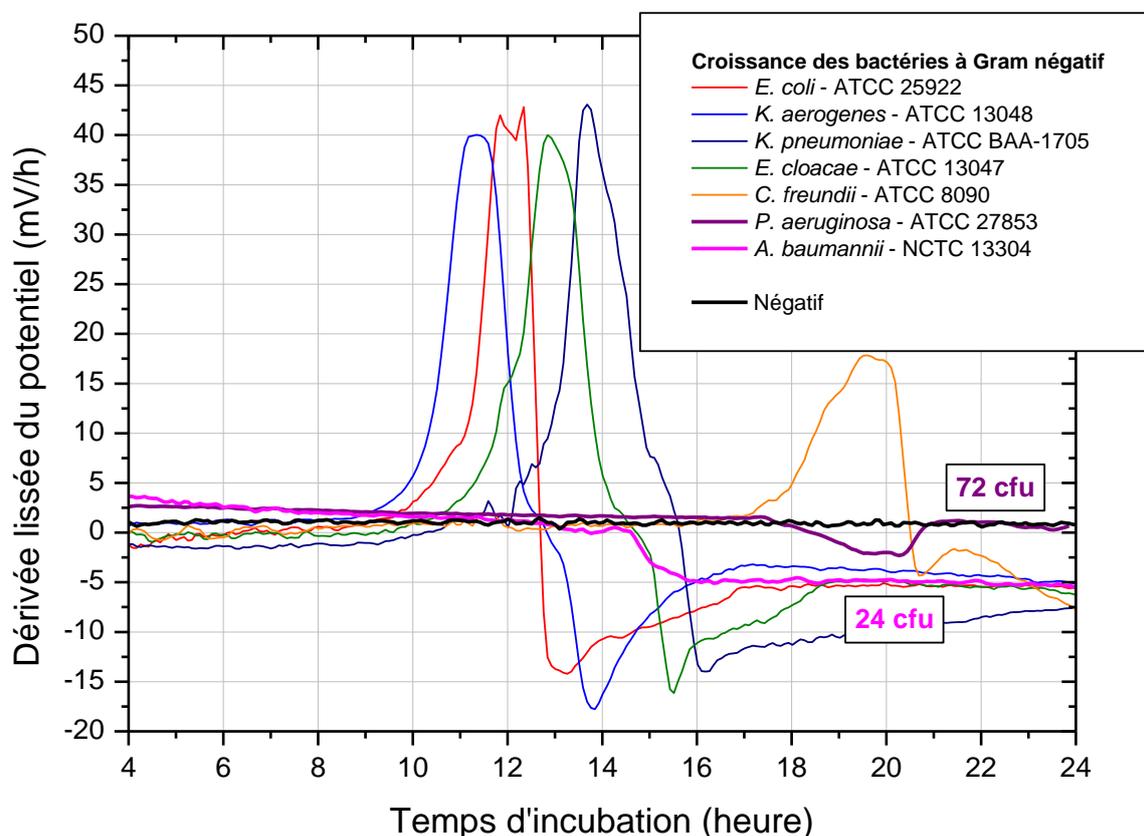


Figure 3-19 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour 7 espèces de bacilles à Gram négatif et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le Bact/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm. *P. aeruginosa* a été testée 3 fois, *A. baumannii* a été testée 3 fois.

Les origines des profils de dérivée de potentiel seront étudiées plus en avant dans le **Chapitre 4**. La conclusion apportée par la **Figure 3-19** est la présence de différences nettes entre deux espèces bactériennes à Gram négatif, visibles grâce à notre dispositif.

3.2. Les bactéries à Gram positif

Comme expliqué brièvement dans le **paragraphe 1 - Chapitre 2**, les bactéries peuvent se regrouper en deux grands groupes, dépendant de leurs réponses à la coloration dite « de Gram » : les Gram négatif et les Gram positif. Cette coloration différentielle permet de distinguer deux grands types de structures membranaires. Les bactéries à Gram négatif sont majoritairement représentées dans les infections

sanguines c'est pourquoi leur étude a été privilégiée en premier lieu. Cependant, de nombreuses bactériémies sont dues à des bactéries à Gram positif, notamment *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* (et *faecium*) appartenant au groupe ESKAPE.

3.2.1. Les staphylocoques

D'après une étude très complète de Diekema *et al.*¹⁹, le genre *Staphylococcus* a représenté 21 % des causes de bactériémies en Europe entre 2013 et 2016 (contre 9,4 % pour le genre *Enterococcus*), c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces micro-organismes.

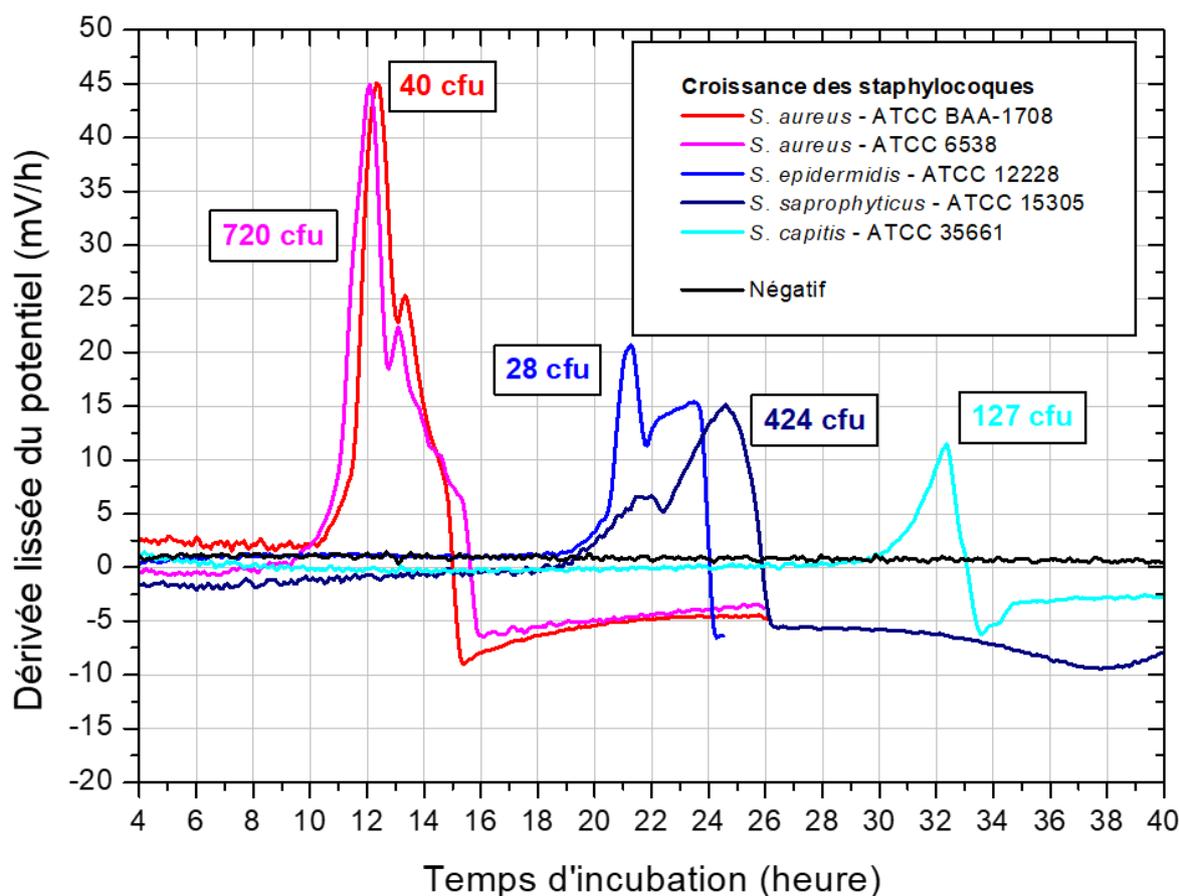


Figure 3-20 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour 5 souches de staphylocoques et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm. *S. aureus* a été testée 7 fois, *S. epidermidis* a été testée 12 fois, *S. saprophyticus* a été testée 1 fois, *S. capitis* a été testée 1 fois.

Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif fortement présentes dans les infections nosocomiales^{18,19}. Ils peuvent se séparer en deux groupes suivant leur capacité à faire coaguler le plasma sanguin :

- Les staphylocoques à coagulase positive, comme par exemple *Staphylococcus aureus* ;
- Les staphylocoques à coagulase négative, tels que *Staphylococcus epidermidis*.

Outre les temps de détection très différents, les empreintes électrochimiques des deux types de staphylocoques présentent des différences particulièrement importantes, ce qui peut permettre de les identifier, une information précieuse pour les praticiens hospitaliers (**Figure 3-20**). Ces empreintes sont également nouvelles par rapport à celles observées pour les bactéries à Gram négatif.

3.2.2. Les autres coques à Gram positif

Les entérocoques et les streptocoques sont deux autres genres bactériens à Gram positif retrouvés dans les infections sanguines. Pour un souci de clarté des graphiques, les empreintes électrochimiques, toujours avec la polyaniline, de ces micro-organismes sont visibles seules en **Figure 3-21**.

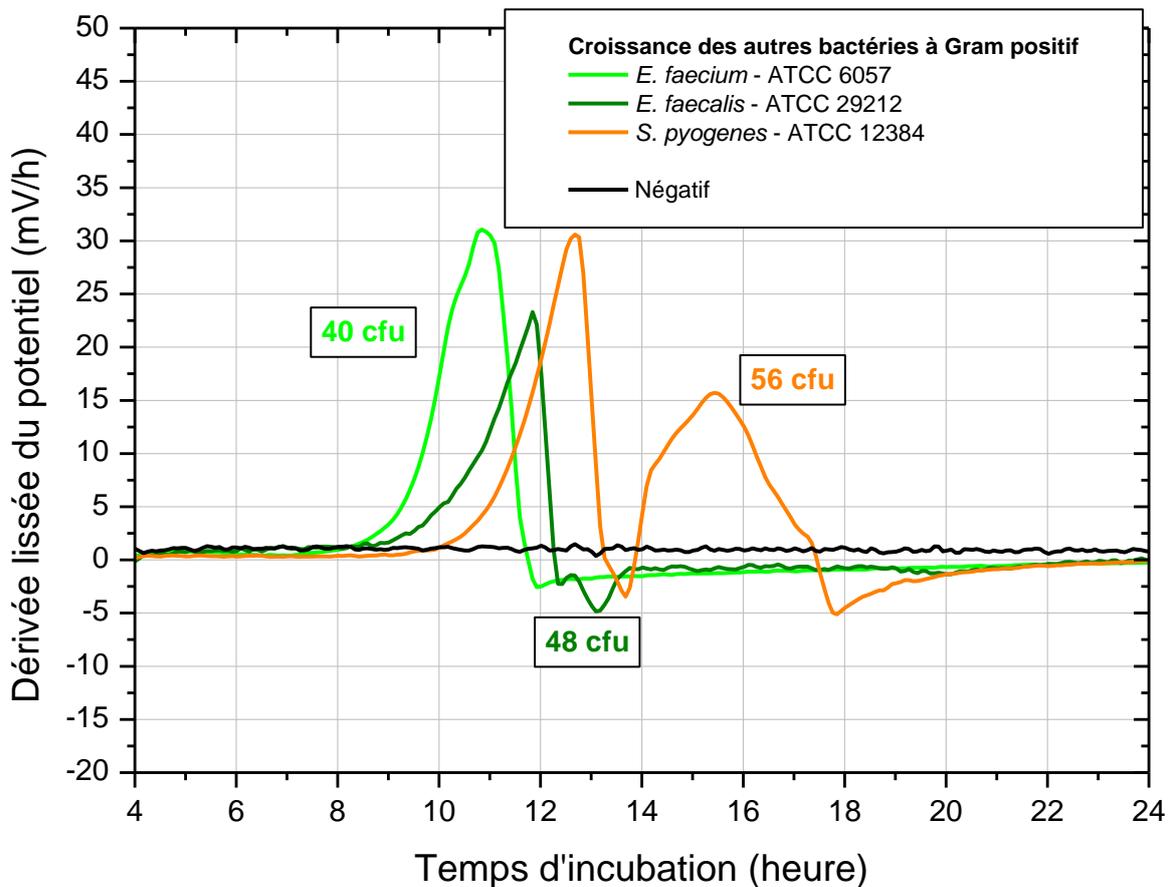


Figure 3-21 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour 3 souches de cocci à Gram positif et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm. *E. faecium* a été testée 1 fois, *E. faecalis* a été testée 3 fois, *S. pyogenes* a été testée 3 fois.

De nouveau, des empreintes électrochimiques particulières sont observables, permettant de détecter la croissance des bactéries mais également de différencier l'espèce présente par rapport à celles déjà testées.

3.3. Détection de fongémies

La base de données a été principalement construite avec différentes bactéries (Gram + et Gram -). Cependant, certaines levures sont retrouvées dans des sangs de patients infectés (10 % des cas dans l'étude de Orsini *et al.*²²). L'utilisation de quelques souches de levures a donc semblé être importante pour confirmer le fonctionnement du dispositif développé à cet autre type de pathogène.

Trois souches de levures (du genre *Candida*) ont été testées, toujours dans du sang humain, à différents inoculums (**Figure 3-22**).

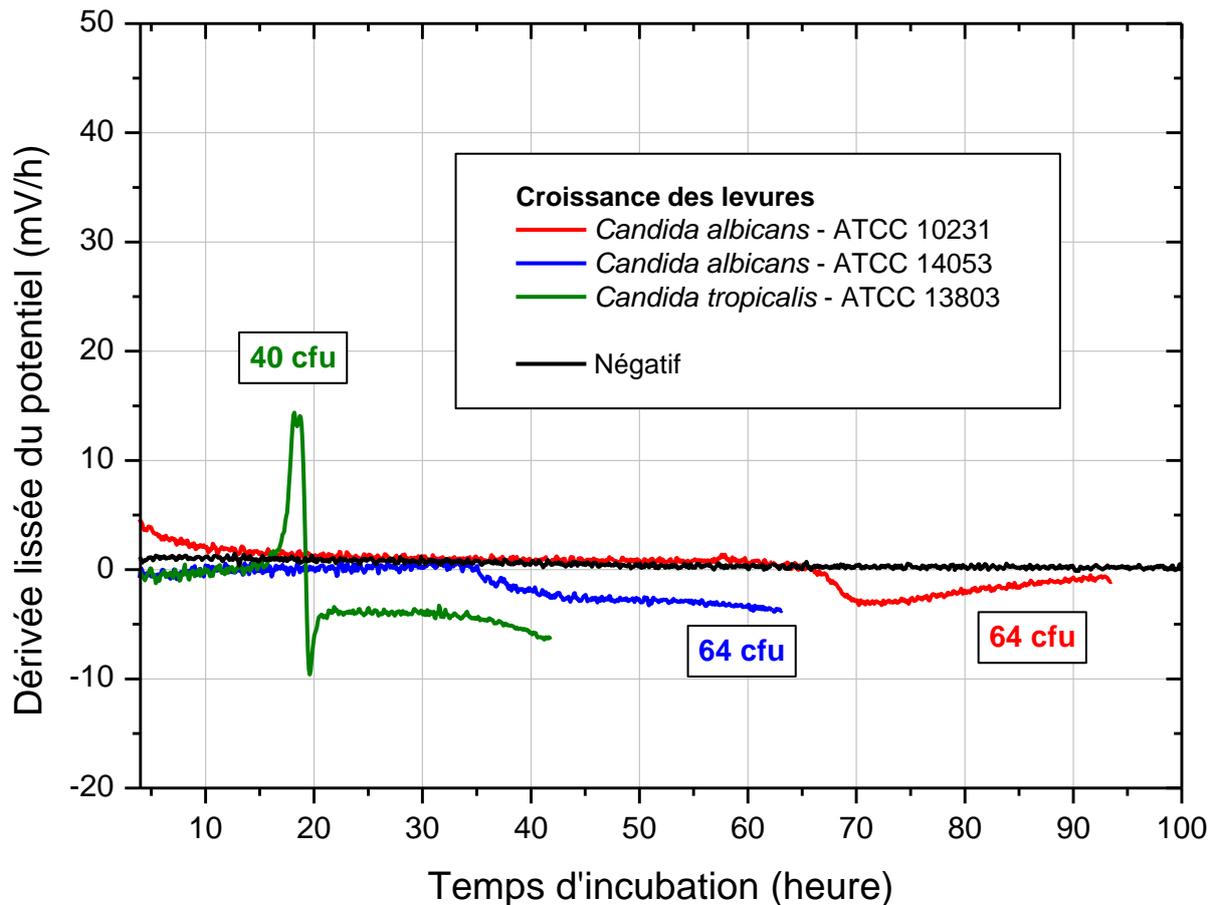


Figure 3-22 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour 3 souches de levures du genre *Candida* et comparaison avec un négatif. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm. *C. albicans* a été testée 2 fois, *C. tropicalis* a été testée 1 fois.

Les temps de détection, temps auxquels les dérivées des courbes dites *positives* diffèrent de la courbe dite *negative*, sont en général plus longs que pour la majorité des bactéries, ce qui est vérifié dans la littérature⁵. On remarque également un comportement différent pour deux espèces du même genre : la dérivée du potentiel de la polyaniline diminue pendant une croissance de *Candida albicans* mais augmente pour une croissance de *Candida tropicalis*. L'origine de cette différence n'a pas été étudiée pour le moment.

Au vu des courbes obtenues, il semble tout à fait probable que notre système de détection électrochimique puisse s'appliquer à l'ensemble des micro-organismes responsables d'infections sanguines (bactéries et champignons). De plus, les différentes empreintes électrochimiques, obtenues via les électrodes en polyaniline (**Figure 3-17** à **Figure 3-22**) sont reconnaissables et interrogent quant à leur utilisation pour une éventuelle identification du micro-organisme détecté.

Un utilisateur, avec un peu d'expérience et de données, pourrait reconnaître ces empreintes à l'œil nu. Cependant, l'intérêt de cette technologie est avant tout de gagner du temps pour le diagnostic, une automatisation du système est donc nécessaire.

4. Le calcul du temps de détection

Les dispositifs utilisés sont des plateformes électrochimiques avec 8 électrodes de travail, 4 matériaux différents sont testés. A première vue, *i.e.* sans analyse des données par apprentissage machine, la polyaniline est le matériau d'électrode testé le plus performant pour identifier les micro-organismes étudiés grâce aux différentes empreintes électrochimiques. Il a donc été choisi pour illustrer l'ensemble de ce chapitre. Cependant, les différentes croissances bactériennes rapportées jusqu'à présent ont été étudiées avec les quatre matériaux d'électrodes.

Chaque espèce bactérienne semble pouvoir être associée à un profil électrochimique de la polyaniline mais également à un profil différent pour chaque matériau testé comme le montre la disparité des réponses pour une croissance d'*Escherichia coli* présentée en **Figure 3-23**.

Cette réponse multi-matériaux permet une caractérisation plus fine de chaque pathogène et peut être exploitée pour automatiser et améliorer la fiabilité de l'identification des micro-organismes en temps réel. De plus, en observant les valeurs obtenues avec les expériences sans bactérie (les négatifs) il est possible de déterminer des seuils pour définir des courbes positives, c'est-à-dire qui transcrivent la présence de bactéries dans le flacon.

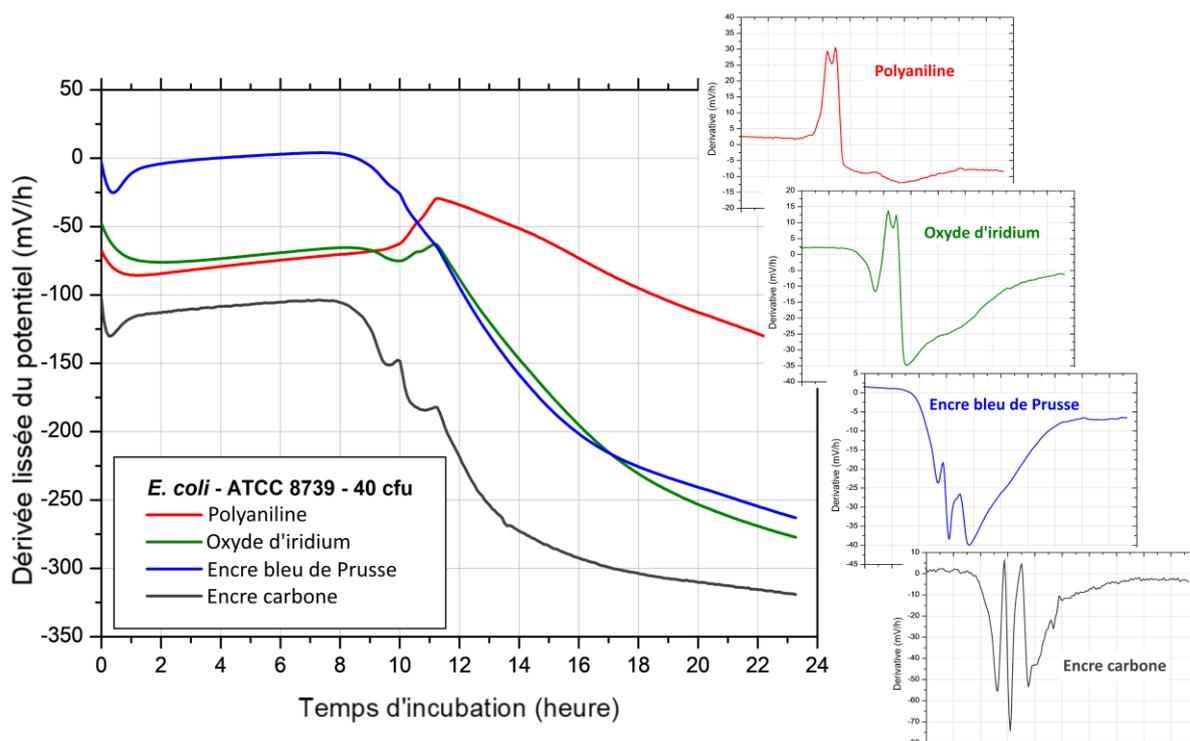


Figure 3-23 : Courbes potentiométriques et de dérivées lissées du potentiel associées de 4 matériaux d'électrodes différents pour une même culture d'une souche d'*E. coli*. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

L'encre carbone semble, au vu des expériences réalisées, le matériau d'électrode dont le potentiel est le plus sensible à la croissance bactérienne, en termes de délai de détection (notés TTP pour *Time-To-Positivity*). Ce matériau ayant pour potentiel d'abandon un potentiel mixte, contrairement aux trois autres matériaux qui possèdent des signatures en potentiel associées à la présence d'un matériau redox (PANI, IrOx et P2), il est assez logique qu'il soit plus sensible à la production d'espèces redox d'origine bactérienne. C'est donc ce matériau qui a été choisi pour calculer les temps de positivité.

Méthode pour calculer les seuils de détection.

Sur 4 expériences négatives, effectuées dans du sang humain, les dérivées lissées du potentiel des électrodes d'encre carbone sont observées entre 4 h et 120 h d'incubation. Aucune n'a été supérieure à +4,7 mV/h ou inférieure à -6 mV/h.

Cependant, certaines dérivées lissées du potentiel, enregistrées pour des croissances bactériennes, sont en dehors des bornes [-6 ; +4,7] mV/h pour des durées très faibles. Comme montré en **Figure 3-24**, ces valeurs de seuils entraîneraient un délai de détection (ici de 4 h) non relié à la croissance bactérienne.

Les valeurs de seuils de détection sont donc choisies afin de permettre de classer correctement les négatifs en tant que négatifs mais également afin de trouver des temps de détection cohérents avec la littérature pour les positifs.

On considère donc qu'une dérivée lissée du potentiel d'une électrode d'encre carbone est associée à une croissance bactérienne **si elle est supérieure à +6 mV/h ou inférieure à -7 mV/h**. Les délais de détection calculés avec ces valeurs doivent cependant être considérés comme des ordres de grandeur.

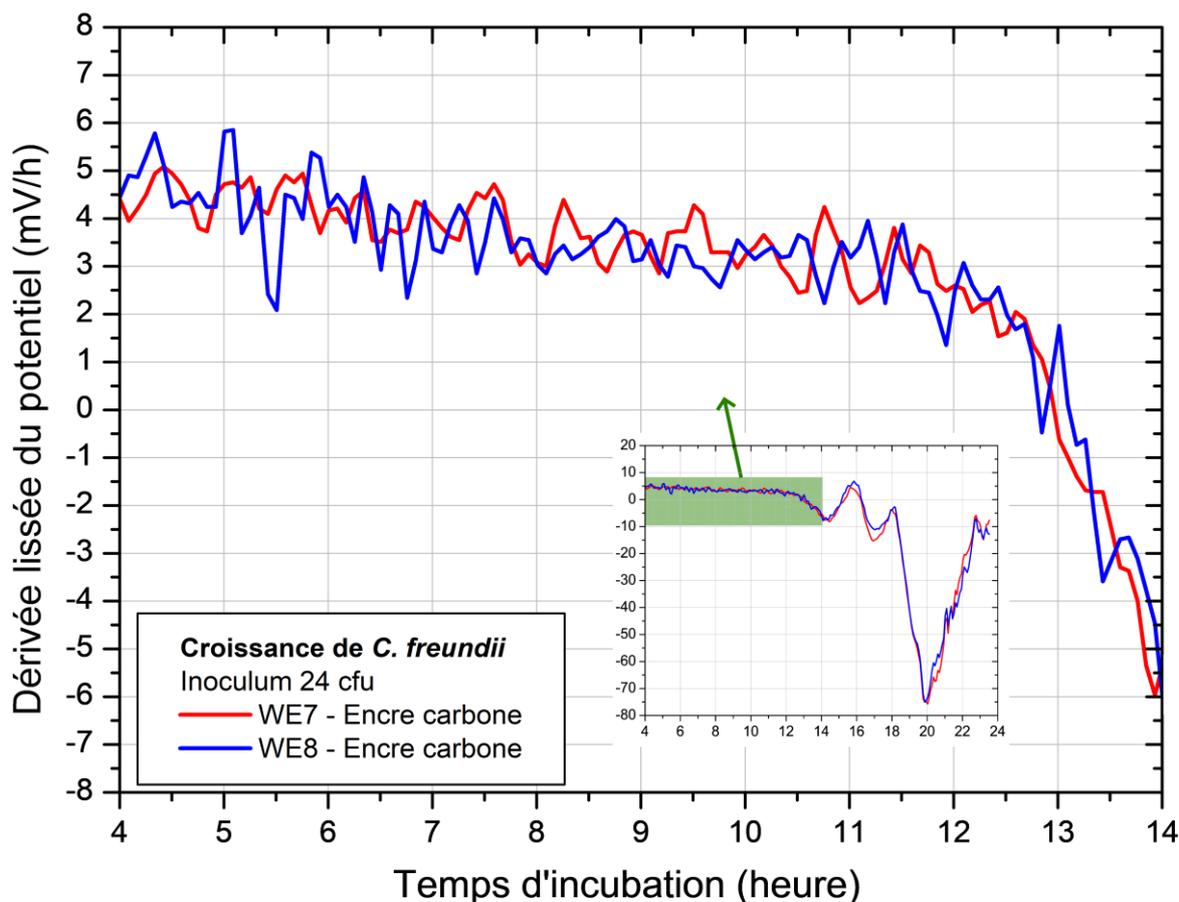


Figure 3-24 : Courbes de dérivées lissées de l'encre carbone pour une croissance de *Citrobacter freundii*. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm. La détection de la croissance se fait autour des 13 h d'incubation mais la dérivée lissée du potentiel de l'électrode 8 est supérieure à +4,7 mV/h dès 4 h d'incubation. La valeur seuil permettant de calculer le temps de détection ne peut donc pas être +4,7 mV/h.

Les résultats préliminaires obtenus lors de ma thèse permettent de comparer la méthode électrochimique aux automates d'hémoculture commerciaux. Le **Tableau 3-1** illustre ces différences de TTP pour quelques espèces bactériennes.

Une étude publiée en 2020 de *Li et al.*⁵ a comparé 3 systèmes d'hémoculture en terme de TTP pour plusieurs micro-organismes : le Bact/ALERT® Virtuo , le Bact/ALERT® 3D et le BACTEC FX. Cet article conclut sur la plus grande rapidité du système Virtuo, commercialisé par la société bioMérieux, vis-à-vis des deux autres modèles d'automates.

Nous avons donc décidé de nous comparer au Bact/ALERT® Virtuo, grâce aux temps de détection provenant de cette publication, où les hémocultures ont été effectuées sur sang de cheval défibriné. L'objectif de cette comparaison est avant tout de s'assurer que le dispositif développé pendant ma thèse n'est pas très en dessous des performances (en terme de rapidité) des systèmes commerciaux. Du sang de cheval défibriné (SR00050C, Thermo Scientific™) a été testé pendant ce doctorat sur quelques expériences (cf. **Chapitre 4**) et les délais de détection obtenus dans ce milieu sont semblables à ceux trouvés dans du sang humain.

D'après les valeurs reportées dans le **Tableau 3-1**, et malgré le petit nombre d'échantillons, on peut déduire de ces résultats deux caractéristiques importantes concernant la méthode développée pendant ma thèse :

1. Les matériaux et les méthodes de fabrication utilisés n'engendrent pas de délais significatifs dans la détection.

➔ **Notre système ne défavorise pas la croissance microbienne, pour l'ensemble des micro-organismes testés.**

2. Nos valeurs de temps de détection sont très proches de celles obtenues par un système commercial de dernière génération, parfois même inférieures, alors même qu'il s'agit d'un prototype et que tous les éléments n'ont pas encore été optimisés.

➔ **Notre système, en plus d'envisager une mesure portable, fournit un temps de détection aussi rapide que l'état de l'art.**

Il est à noter que les valeurs reportées dans le **Tableau 3-1** ont été obtenues, pour le Bact/ALERT® Virtuo, dans un mélange [Bact/ALERT + Sang de cheval défibriné], et pour notre dispositif, dans un mélange [Bact/ALERT + Sang humain total].

Tableau 3-1 : Comparatif des temps de détection (TTP) calculés pour différentes espèces bactériennes entre le BacT/ALERT® VIRTUO⁵ et notre dispositif. Les TTP obtenus avec notre dispositif ont été calculés sur une expérience dont l'inoculum est indiqué dans la colonne précédente.

Micro-organismes	ATCC	Inoculum (cfu/flacon)	TTP (en heure) obtenus par le BacT/ALERT® Virtuo (Min / Max)	ATCC	Inoculum (cfu/flacon)	TTP (en heure) calculés pour l'électrode de carbone du flacon instrumenté
Bactérie à Gram positif						
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	65	9.70 / 9.88	BAA-976	88	10.3
				11632	72	9.5
				BAA-1708	40	10.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inconnu	26	15.33 / 16.31	122287	28 / 23	18.9 / 19.5
				35984	28 / 15	14.4 / 14.5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Inconnu	23	14.57 / 15.72	12344	20	11.1
				12384	56	11.5
Bactérie à Gram négatif						
<i>Escherichia coli</i>	25922	30	9.80 / 9.90	25922	40 / 16	9.4 / 10.4
<i>Enterobacter cloacae</i>	Inconnu	39	10.30 / 11.10	13047	72 / 40	10.5 / 11.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inconnu	75	7.70 / 8.20	BAA-1705	24 / 13	12.3 / 11.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inconnu	Inconnu	10.73 / 11.21	27853	72 / 48	18.0 / 13.7

5. Identification par apprentissage machine

Les signatures électrochimiques montrées en début de chapitre, présentent des différences inter-espèces. La croissance d'une espèce bactérienne semble induire des profils de potentiel (et de dérivée de potentiel) spécifiques mais différents suivant le matériau d'électrode choisi.

Le premier objectif de mon travail de thèse portait sur la détection « simple » des croissances bactériennes. Cependant, les informations obtenues avec le dispositif potentiométrique utilisé nous ont conduit à la recherche d'une forme d'identification, novatrice par rapport à l'état de l'art.

La classification des données est basée sur la spécificité des profils potentiométriques. Dans ce but, un algorithme est entraîné à reconnaître des caractéristiques propres à chaque bactérie, sur un jeu de données pour lesquelles la réponse est connue (partition d'apprentissage, appelée aussi partition d'entraînement). Puis nous testons les performances de l'algorithme entraîné en lui demandant de classer une courbe absente de la partition d'apprentissage (partition de test). La confrontation de l'identification donnée par l'algorithme entraîné au résultat réel permet, lorsque différentes partitions apprentissage/test sont effectuées, d'obtenir une estimation du TIC (Taux d'Identification Correcte), exprimé en pourcentage.

Le développement des algorithmes, qui ont permis l'obtention de toutes les figures présentées dans cette partie, a été réalisé en collaboration avec Tommy Dedole (ingénieur de recherche au CEA) et Pierre Bouvet (doctorant au CEA). Leurs compétences et leur travail ont été déterminants pour l'avancée de ce projet et les découvertes réalisées.

5.1. Traitement des données

5.1.1. Choix d'un descripteur adapté

L'objectif de ce traitement de données est d'obtenir le plus d'informations pertinentes permettant de différencier toutes les bactéries les unes des autres, et cela uniquement avec 8 courbes potentiométriques. Les données brutes de chaque courbe subissent différentes transformations pour en extraire un descripteur qui pourra ensuite être étiqueté avec le matériau d'électrode et l'identité de la bactérie correspondante (**Figure 3-25**).

Comme montré précédemment dans ce chapitre, un profil potentiométrique bactérien dépend du micro-organisme, du matériau d'électrode et de l'inoculum. Cependant ce dernier n'est en pratique pas connu lorsqu'une hémoculture est réalisée. C'est pourquoi le descripteur, *i.e.* le vecteur qui va décrire la signature potentiométrique d'une hémoculture, se doit d'être indépendant de l'inoculum.

Or nous avons constaté dans le **paragraphe 2.3.1 - Chapitre 3** que l'inoculum n'influe que sur le temps de latence : en inoculant avec une plus forte biomasse, le profil potentiométrique, exprimé en dérivée du potentiel, est simplement décalé vers les temps de positivité plus courts. C'est pourquoi nous proposons de traiter les données avec un descripteur indépendant vis-à-vis du temps de latence : les profils seront en quelque sorte tous recalés temporellement sur le temps de positivité de l'hémoculture, qui sert de référence $t=0$. Pour parvenir à cela il suffit, lorsque l'on passe dans l'espace de Fourier, de ne prendre en compte que le module de la transformée de Fourier (FFT).

En effet, toute translation dans le domaine temporel du suivi potentiométrique se traduit par un déphasage²³, sans modifier le module de la transformée de Fourier.

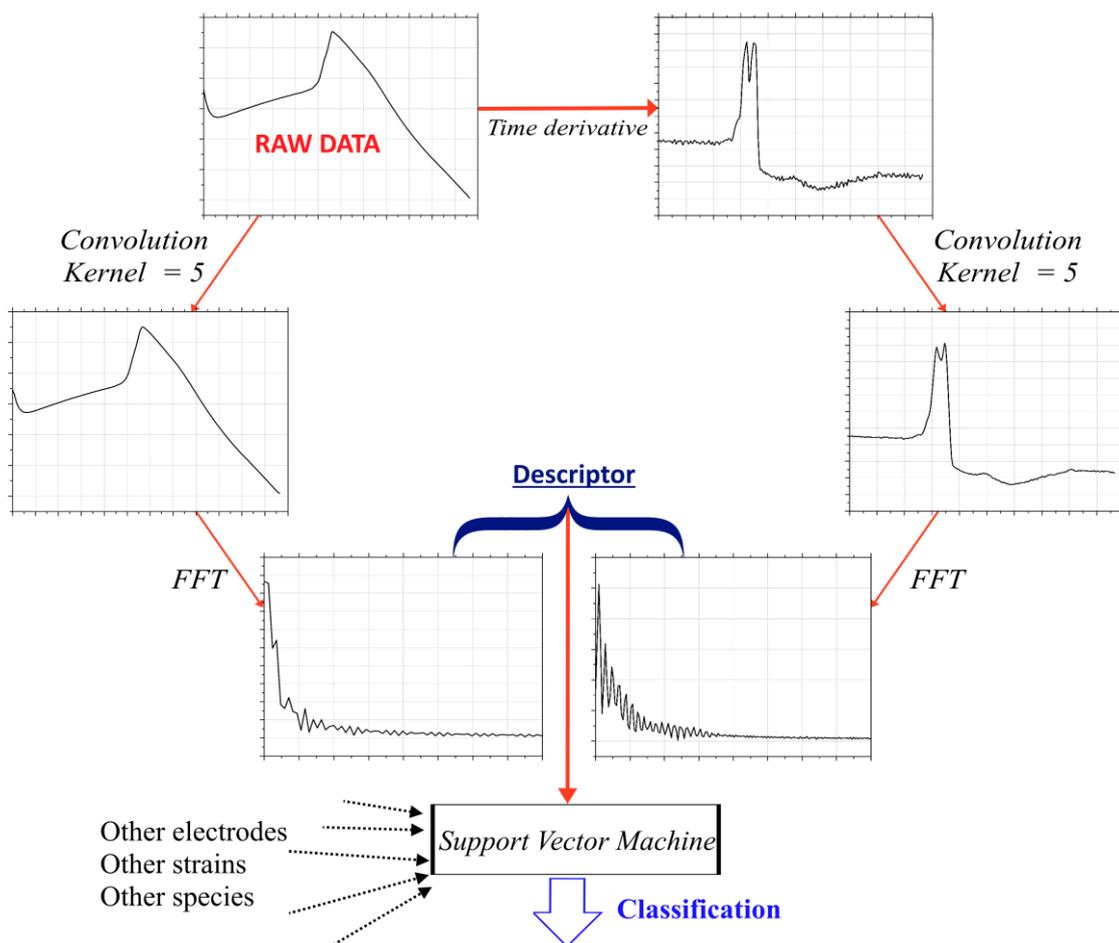


Figure 3-25 : Schéma explicatif du traitement de données utilisé. A partir de la donnée brute (le potentiel) on obtient un vecteur composé de modules calculés à partir de deux transformées de Fourier. L'ensemble des modules correspondant aux fréquences choisies permet de construire un descripteur, définissant la bactérie détectée en fonction de l'électrode et de son matériau. (FFT : Transformée de Fourier).

Les suivis potentiométriques ne seront plus décrits par une grandeur continue (potentiel ou dérivée) en fonction du temps, mais par des valeurs discrètes de modules correspondant à des fréquences. De cette façon, le profil de la courbe devient la donnée d'intérêt, **sans prendre en compte le temps auquel cette courbe démarre son évolution**.

La donnée brute (le potentiel enregistré d'une électrode au cours du temps) est ainsi transformée à travers plusieurs étapes :

- i. Une convolution avec un Kernel de 5 est appliquée au potentiel (lissage) ;
- ii. En parallèle, le potentiel est dérivé par rapport au temps ;
- iii. Une convolution avec un Kernel de 5 est appliquée à la dérivée du potentiel (lissage) ;
- iv. La transformée de Fourier des deux courbes lissées est calculée ;
- v. Les modules correspondant aux fréquences choisies sont récupérés afin de construire un descripteur définissant la bactérie détectée en fonction de l'électrode et de son matériau.

L'utilisation de la dérivée et de la convolution des courbes a été initialement choisie pour permettre une visualisation de la détection sans prendre en compte les variations des potentiels initiaux inter-électrodes et inter-expériences. Ici, ces deux transformations de la donnée brute sont en réalité des filtres passe-haut. Ils sont utilisés pour éliminer les composantes à basse fréquences, peu ou pas pertinentes pour l'identification.

Pour chaque expérience, le descripteur qui caractérise la bactérie testée est donc composé de modules et de fréquences à raison d'une fonction discrète « module = $f(\text{fréquence})$ » par électrode.

Pour améliorer les performances de l'identification, il est nécessaire de choisir les fréquences qui sont discriminantes. Par exemple si toutes les FFT des chronopotentiogrammes de la polyaniline (quelle que soit la bactérie) donnent le même module pour 1,76 Hz alors la fréquence est inutile pour identifier le micro-organisme.

Les fréquences utilisées ont été trouvées par test itératif : toutes les combinaisons de fréquences sont testées une par une afin de trouver la combinaison la plus avantageuse. Elles sont répertoriées dans le **Tableau 3-2**. Pour chaque expérience, le descripteur qui caractérise la bactérie testée est donc composé de 59 modules correspondant aux 59 fréquences pertinentes.

On remarque que les fréquences utilisées ne sont pas les mêmes pour la dérivée et le potentiel : l'utilisation de ces deux grandeurs permet d'augmenter la quantité d'informations décrivant chaque expérience. Cette amélioration a été vérifiée expérimentalement par une légère augmentation des performances d'identification en utilisant dérivée + potentiel.

Tableau 3-2 : Nombre des premières fréquences choisies, pour la FFT du potentiel lissé et pour la FFT de la dérivée lissée, pour chaque matériau d'électrode. Avec le traitement de données utilisé, ces 59 fréquences suffisent à discriminer les bactéries testées.

	Polyaniline	Oxyde d'iridium	Encre "bleu de Prusse"	Encre carbone
Potentiel	8	4	4	0
Dérivée	17	5	21	0

Les données obtenues avec l'encre carbone BQ242 ne sont pas utilisées pour l'identification car les signatures électrochimiques associées sont trop peu spécifiques (détails en **Figure 3-32**).

Cette observation peut s'expliquer par la nature de ce matériau. En effet, l'encre carbone n'est pas sensible au pH et ne contient pas de système redox interne. Cela fait de ce matériau un bon capteur du changement de la solution lorsque les bactéries s'adsorbent à la surface avec leurs propriétés lipophiles (d'où sa pertinence pour calculer des temps de détection) mais un très mauvais descripteur des spécificités de ce changement : toutes les signatures électrochimiques de la BQ242 se ressemblent.

5.1.2. Choix d'un classifieur adapté

Chaque expérience provenant de notre base de données est à présent représentée par un vecteur à 59 dimensions (les 59 fréquences du **Tableau 3-2**). L'enjeu à présent est de choisir un algorithme de classification (un classifieur) adapté à l'usage souhaité.

Il existe plusieurs méthodes permettant de classer des données, une des plus couramment employées (et des plus simples à appréhender) est l'utilisation d'une machine à vecteurs de support, aussi appelée SVM (*Support Vector Machine*).

L'objectif de ce type d'algorithme est de séparer un ensemble de données en deux ou plusieurs classes grâce à un hyperplan. Cet hyperplan est calculé de manière à obtenir une séparation optimale, c'est-à-dire qui engendrera une marge maximale entre les classes.

Visualiser un classifieur.

Notre base de données peut être séparée en deux classes d'apprentissage : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Le traitement de données explicité plus haut a permis de représenter toutes les expériences par des vecteurs à 59 dimensions, dans cet exemple on suppose que ces vecteurs n'ont que 2 dimensions.

Dans un espace 2D, on peut représenter toutes les expériences réalisées par des points, rouges pour les Gram + et bleus pour les Gram - (**Figure 3-26**). La machine à vecteurs de support permet de tracer l'hyperplan permettant la séparation maximale. Cette séparation est calculée à partir des points, de classes différentes, les plus proches : les vecteurs de support.

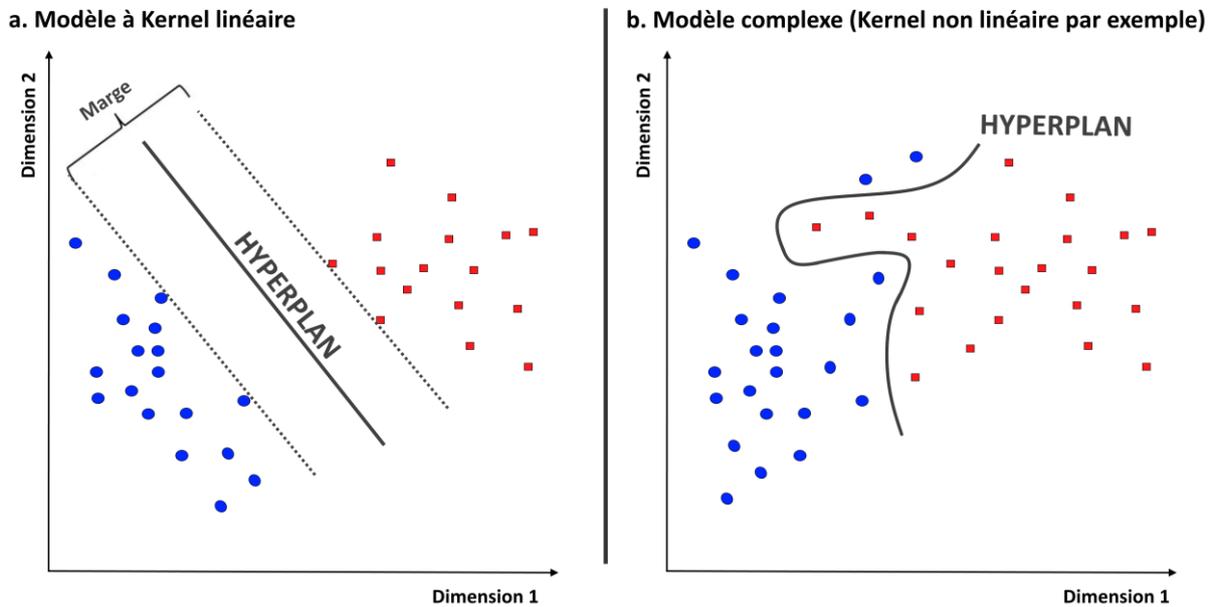


Figure 3-26 : Représentation schématique de la méthode de classification SVM grâce à un classifieur (SVC) à Kernel linéaire (a.) et à Kernel non linéaire (b.).

La base de données utilisée pour quantifier les performances d'identification possibles de notre système est composée de peu d'échantillons (60 expériences) mais avec des différences marquées entre les différentes classes : une SVM à Kernel linéaire (**Figure 3-26 – a.**) semble adaptée à notre usage.

L'utilisation d'une SVM à Kernel non linéaire, ou tout autre modèle plus complexe (**Figure 3-26 – b.**), est limitée par la présence d'un phénomène de sur-apprentissage (ou *overfitting*) : l'apprentissage est alors très dépendant de la base d'apprentissage et ses performances se révèlent médiocres face aux données de la partition de test, ou face à l'ajout de nouvelles données. C'est pourquoi un modèle trop complexe de classification peut se révéler moins performant qu'un modèle plus simple.

Une SVM avec un Kernel linéaire est donc le modèle retenu pour notre classification. Une augmentation conséquente de la base de données permettrait d'utiliser des algorithmes plus complexes, avec des résultats probablement meilleurs que ceux présentés ci-dessous.

5.2. Performances d'identification

Nous avons à présent une méthode permettant de transformer une expérience de mesure potentiométrique dans du sang inoculé en un vecteur à 59 dimensions. De plus, un classifieur adapté a été choisi afin de pouvoir séparer ces vecteurs en fonction de classes, c'est-à-dire des caractéristiques des bactéries détectées (Gram, genre ou espèce par exemple).

Il faut maintenant définir une méthode de validation : elle permettra de vérifier si un vecteur est correctement classé et donc de calculer la performance d'identification.

La base de données utilisée dans cette partie est constituée de 60 expériences, toutes effectuées dans du sang humain total issu de patients sains. Ces expériences ont été répétées au moins une fois chacune et correspondent à une diversité de 14 espèces bactériennes dans 9 genres différents (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*). Chacune de ces expériences est donc représentée par un descripteur à 59 dimensions.

L'objectif de cette base de données a été d'apporter un aspect générique à notre méthode d'identification, les genres bactériens choisis sont donc ceux les plus couramment rencontrés en hémoculture (voir **paragraphe 3.6 – Chapitre 2**). Le détail des expériences utilisées pour construire cette base de données (souche, inoculum, sang) est donné en **Annexe III**.

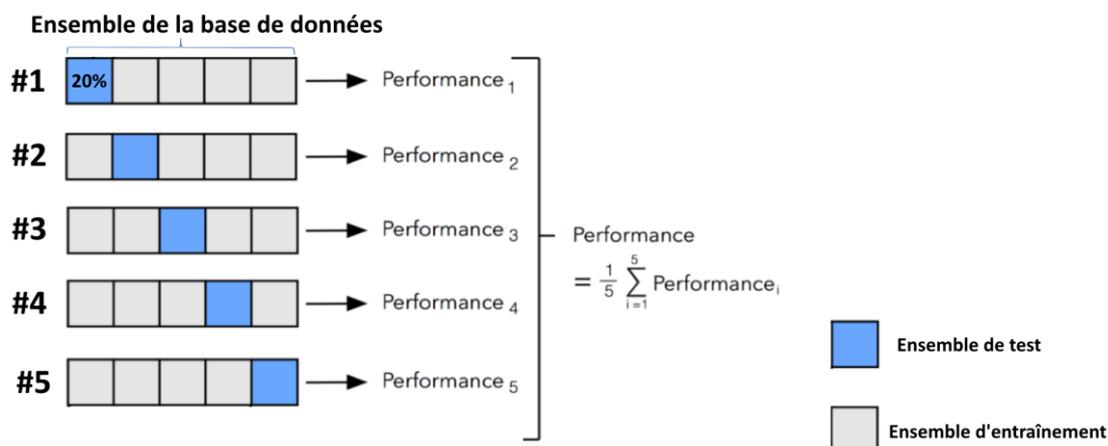
Pour évaluer les performances de classification, deux indicateurs ont été étudiés pendant ce doctorat : l'identification au Gram et l'identification au genre en fonction du temps après positivité. Chacun d'entre eux a nécessité une méthode de validation particulière.

5.2.1. Identifier le Gram d'une bactérie

Le nombre de classes d'apprentissage pour une identification au Gram étant très faible (deux), une validation croisée a été choisie, sur une configuration 80/20 (*five-fold cross-validation*). La base de données est séparée en deux groupes :

- Partition d'apprentissage : 80 % des expériences sont utilisées pour entraîner l'algorithme à reconnaître les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (l'hyperplan est tracé).
- Partition de test : l'algorithme est ensuite testé avec les 20 % restant de la base de données (on mesure la précision de classification des nouvelles données).

La méthode est réitérée 5 fois, de manière à ce chaque donnée serve au moins une fois en tant que test. Les performances de classification au Gram sont donc la moyenne des performances obtenues sur les 5 phases de tests (**Figure 3-27**).



Principe de la validation croisée "classique"

Figure 3-27 : Principe de la validation croisée « classique ». L'ensemble de test représente 20 % de la base de données totale, le procédé n'est répété que 5 fois.

Le pourcentage d'identification, au Gram, correct peut être ainsi tracé en fonction du temps après positivité (**Figure 3-29** - courbe orange).

5.2.2. Identifier le genre d'une bactérie

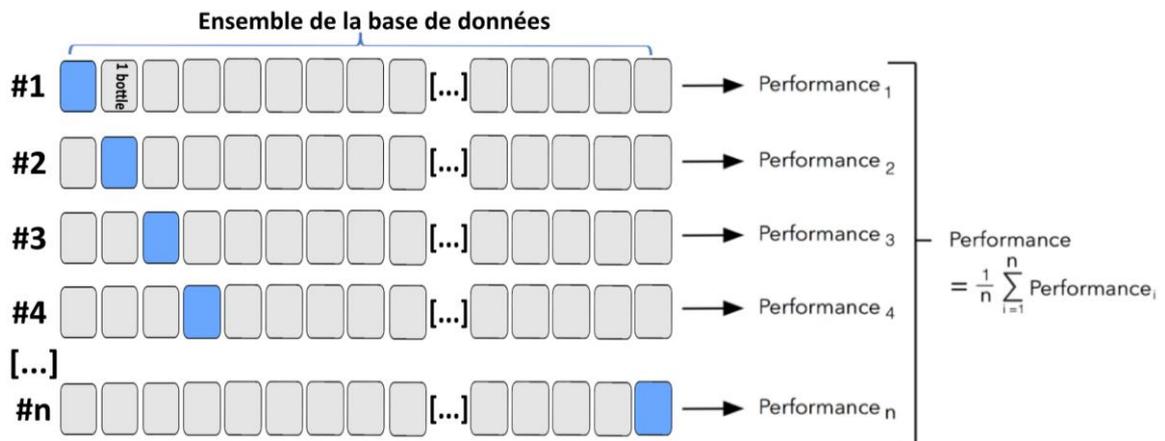
Dans le cas du genre de la bactérie, le nombre de classes d'apprentissage est plus important (ici 9 genres différents). Il est donc possible d'utiliser une méthode de validation plus proche de l'application désirée pour ce dispositif : la méthode LOBO (*Leave One Bottle Out*)[§].

Elle consiste en deux grandes étapes (**Figure 3-28**) :

1. Le programme apprend à associer un descripteur à une bactérie grâce à une base d'entraînement, correspondant à l'ensemble de la base de données, moins une expérience (*i.e.* moins un flacon d'hémoculture).
2. L'expérience retirée de la base de données est ensuite employée pour évaluer les performances de classification de l'algorithme précédemment entraîné.

[§]Plus couramment appelée LOO (*Leave-One-Out*) dans la littérature.

La méthode LOBO ressemble donc à la validation croisée mais en remplaçant la partition d'apprentissage par [100 % - 1] expériences et la partition de test par l'expérience exclue de la partition d'apprentissage.



Principe de la validation croisée *Leave One Bottle Out*

Figure 3-28 : Principe de la validation croisée LOBO. L'ensemble de test représente une unique expérience, le procédé est répété autant de fois que le nombre d'expériences présentes dans toutes la base de données.

Le procédé est répété jusqu'à ce que l'ensemble des 60 expériences aient été utilisées en tant que test. Cette méthode de validation assure des conditions plus proches de la réalité clinique, dans laquelle l'algorithme développé est confronté à une hémoculture inconnue.

Si notre classifieur n'était pas bien adapté, un sur-apprentissage serait particulièrement visible avec cette méthode de validation.

La performance d'identification est la moyenne des résultats obtenus, qu'il est possible de tracer en fonction du temps après positivité.

Et l'identification à l'espèce ?

Elle est envisageable au regard de la spécificité des profils potentiométriques observés mais nécessite une base de données plus conséquente : au moins autant d'expériences pour chaque espèce (*i.e.* chaque classe d'apprentissage) que de dimensions dans le vecteur descripteur (soit 59).

Dans notre cas au moins environ 800 expériences pour 14 espèces.

On remarque alors une augmentation de l'information permettant l'identification, en fonction du temps (Figure 3-29 - courbe bleue).

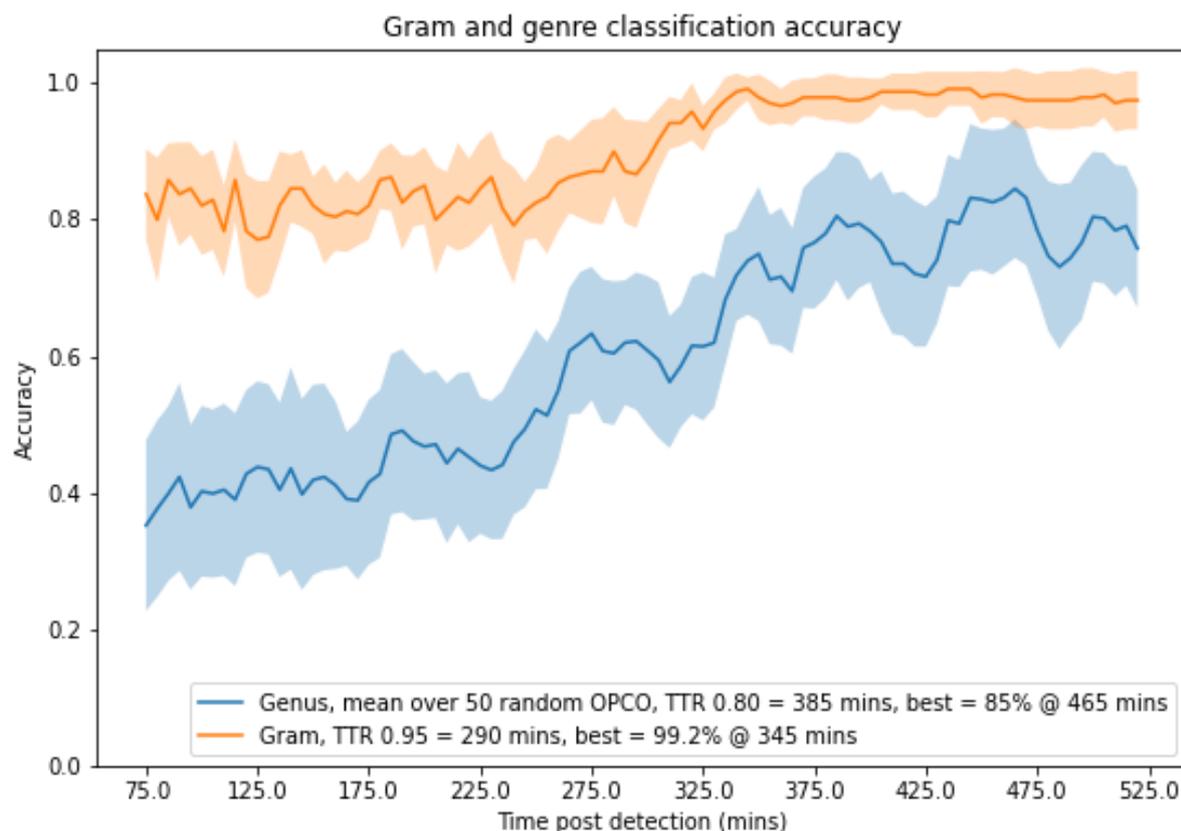


Figure 3-29 : Performance de classification au Gram et au genre en fonction du temps post détection. Le Gram est rapidement correctement identifié tandis que le genre bactérien nécessite plus d'informations pour être déterminé.

Plus le temps post positivité est important, plus les informations collectées sont pertinentes pour identifier le pathogène. Dans un contexte clinique, si le flacon est laissé quelques heures dans l'incubateur après détection (par nécessité ou par volonté), l'identification devient de plus en plus pertinente. On obtient alors des performances intéressantes :

- 5 h 45 (345 min) après détection il est possible de connaître le Gram de la bactérie présente dans le flacon d'hémoculture avec 99 % de précision ;
- 7 h 45 (465 min) après détection son genre est connu avec 85 % de précision.

Malgré ces valeurs de précision élevées, le temps d'analyse post positivité est beaucoup plus long avec notre flacon qu'avec les analyses classiques d'un laboratoire hospitalier :

- Une coloration de Gram peut être effectuée par un technicien de laboratoire en moins d'une heure ;
- Une spectrométrie de masse sur culot d'hémoculture ne prend que quelques dizaines de minutes pour obtenir non pas le genre mais l'espèce bactérienne présente dans le flacon.

En revanche, ces deux méthodes nécessitent du personnel, des réactifs et une ouverture du flacon d'hémoculture, donc une augmentation des risques pour l'opérateur.

L'intérêt de notre pré-identification au Gram puis au genre, via l'analyse des profils potentiométriques, ne réside donc pas dans la rapidité intrinsèque pour obtenir un résultat mais dans la simplification des procédés (moins de réactifs, moins d'opérations manuelles, plus d'analyses automatisées).

En effet, beaucoup de laboratoires ne fonctionnent pas encore 24 h/24 et 7 j/7, les analyses se font donc principalement en journée et un flacon d'hémoculture qui devient positif la nuit attendra le lendemain matin pour l'identification. En connaissant le Gram et le genre dès le matin pour ces flacons, un antibiogramme pourrait être lancé dès le début de journée sans attendre que toutes les identifications soient réalisées.

Compte tenu de la simplicité de la mesure employée (une mesure de potentiel) et de la taille relativement faible de la base de données, ces résultats sont donc extrêmement encourageants concernant une application dans le milieu médical. De plus, les précisions calculées sont à mettre en perspective avec la matrice de confusion visible en **Figure 3-30**.

Les valeurs présentes dans les cases représentent le pourcentage d'identification correcte au genre par l'algorithme développé – par exemple, 82 % des *Enterobacter* ont été correctement identifiées en 465 minutes mais 16 % ont été identifiées comme des *Klebsiella* et 2 % comme des staphylocoques.

On remarque que les genres présentant le plus d'erreurs d'identification - *Citrobacter*, *Pseudomonas* et *Streptococcus* - sont en réalité les genres avec le moins de données (= d'expériences réalisées) dans notre base. Cette faiblesse peut expliquer en partie les temps longs pour obtenir des valeurs de précision importantes.

Par exemple le genre *Pseudomonas* n'est représenté que par 3 expériences alors que le genre *Escherichia* est représenté par 12 expériences : une erreur d'identification pour *Pseudomonas* fait plus chuter le pourcentage d'identification correcte qu'une erreur pour *Escherichia*.

On peut donc raisonnablement attendre des performances plus intéressantes aux temps plus courts, par accroissement du nombre d'expériences dans chaque classe d'apprentissage

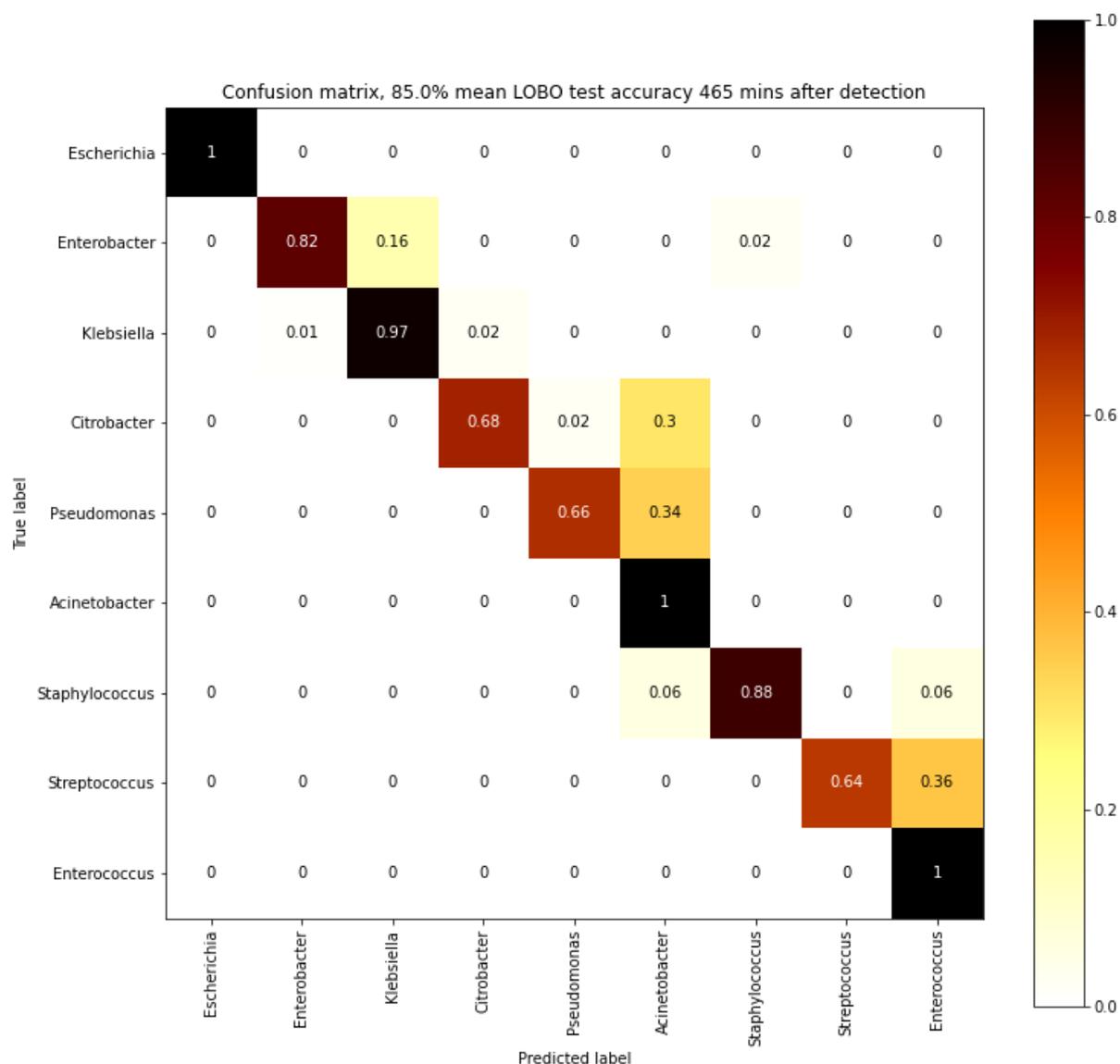


Figure 3-30 : Matrice de confusion, au genre, des bactéries identifiées, 465 minutes (7 h 45) après détection.

5.2.3. Algorithmes « croisés »

Les deux courbes présentées en **Figure 3-29** ont été obtenues indépendamment l’une de l’autre, avec des algorithmes différents. Pourtant, si une hémoculture est classifiée (correctement) comme Gram négative, il est inenvisageable que la bactérie présente soit d’un genre correspondant à un Gram positif. Les données Gram et genre peuvent donc se relier pour affiner, en continu, l’identification.

La **Figure 3-31** représente la performance d’identification au genre des bactéries à Gram négatif, en « autorisant » seulement les genres associés (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*). On remarque que notre méthode permet d’identifier le genre d’une

bactérie à Gram négatif avec 85 % de précision en 5 h 35 après détection, si nous connaissons au préalable son Gram avec certitude.

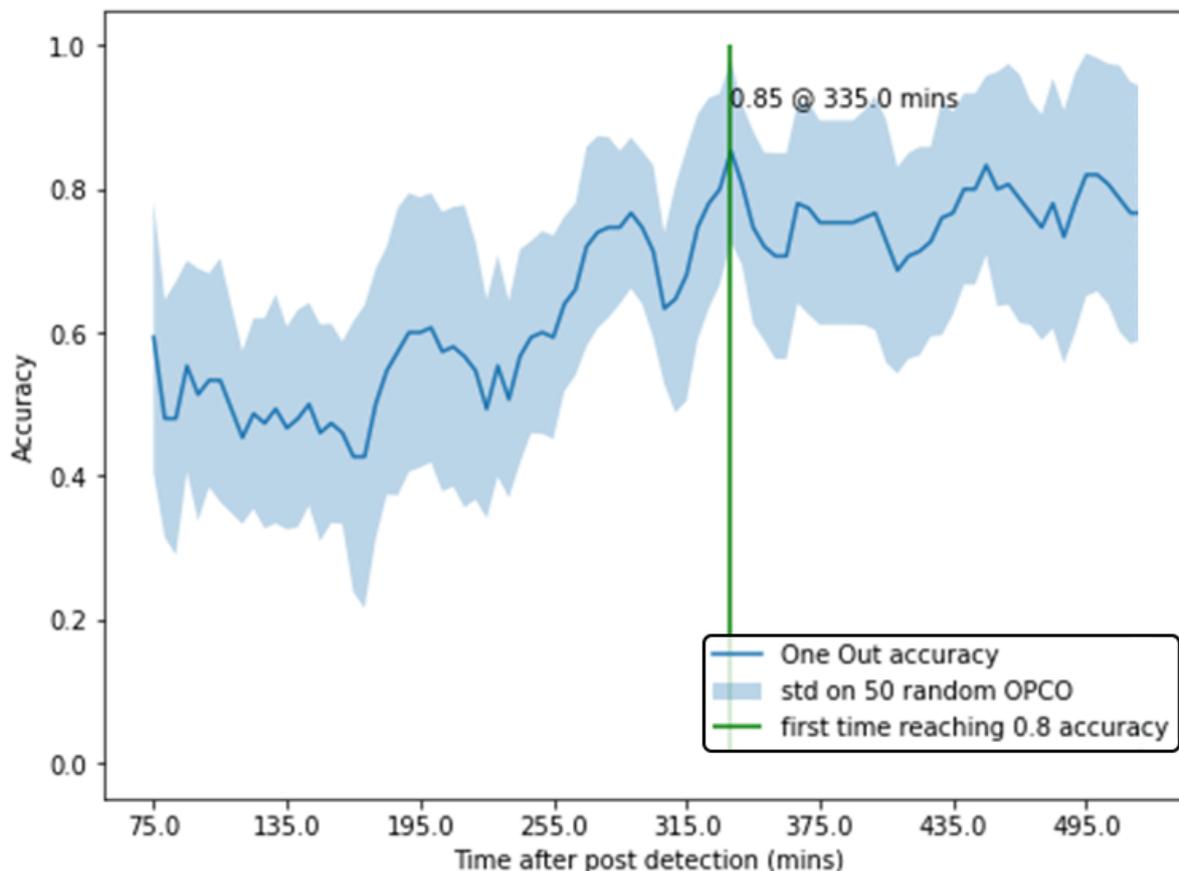


Figure 3-31 : Performance de classification au genre en fonction du temps post détection pour les bactéries à Gram négatif. Le Gram est identifié en 5 h 45. Les données jusqu'à cette borne temporelle sont suffisantes pour identifier le genre (dans les Gram négatif) avec 85 % de précision.

Ce gain de temps, par rapport aux algorithmes indépendants (qui nécessitent 7 h 45) s'explique par la réduction des possibilités de classification. Pour gagner du temps d'identification au genre il suffit donc de connaître le Gram de la bactérie détectée. Or, comme montré **Figure 3-29**, nous sommes capables d'identifier le Gram d'une bactérie présente dans une hémoculture avec plus de 99 % de précision en 5 h 45 après détection.

On peut donc imaginer des algorithmes croisés pour gagner du temps d'identification au genre. Au bout d'un temps donné, on considère que le Gram est correctement identifié et les données obtenues jusqu'alors sont utilisées pour identifier le genre parmi ceux cohérents avec le Gram identifié.

5.3. Contribution des différents matériaux d'électrodes pour l'identification

Grâce aux algorithmes développés, nous sommes capables de tracer les performances d'identification au genre relatives à chaque matériau d'électrode.

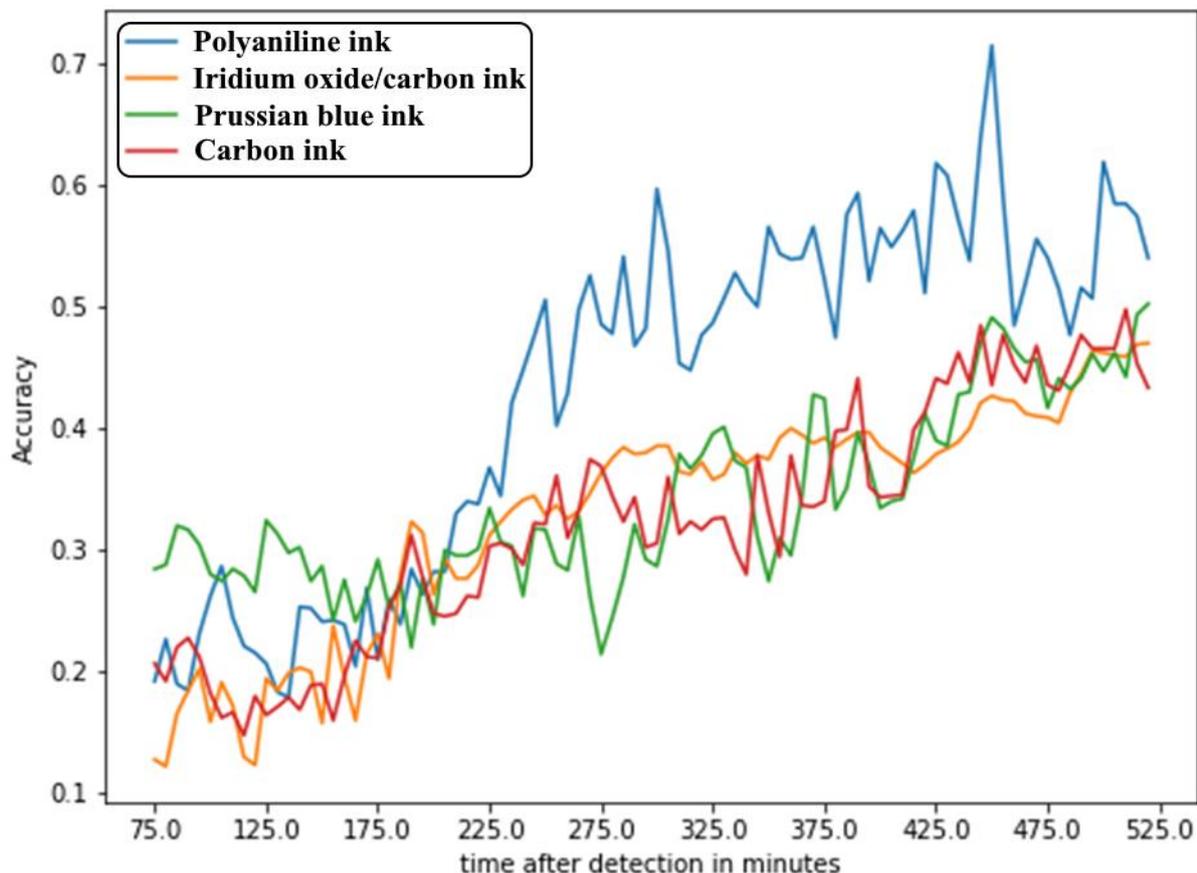


Figure 3-32 : Performance de classification au genre en fonction du temps post détection et en fonction des différents matériaux d'électrodes.

Comme montré en **Figure 3-32**, la polyaniline est le matériau permettant la meilleure discrimination entre genres bactériens. Le caractère multi-matériaux de notre dispositif présente tout de même un réel intérêt pour améliorer les performances : les encres « oxyde d'iridium » et « bleu de Prusse » apportent quelques pourcents de précision supplémentaires.

En revanche, comme explicité précédemment, l'encre carbone BQ242 n'apporte pas de performances supplémentaires concernant l'identification, bien qu'elle soit particulièrement intéressante concernant le temps de détection.

6. Conclusion

L'intégration d'électrodes dans un flacon d'hémoculture a permis d'observer des évolutions potentiométriques très intéressantes et parfois inattendues.

Le sujet initial était le développement d'un suivi du pH pendant une croissance bactérienne mais les matériaux d'électrodes utilisés répondent également à d'autres molécules, vraisemblablement des métabolites électroactifs produits par les micro-organismes.

L'analyse des courbes de potentiel, puis de leurs dérivées au cours du temps, a permis de construire un outil de détection rapide d'une croissance mono-microbienne et également d'obtenir des informations sur le micro-organisme présent dans l'hémoculture. La méthode développée a été testée sur les espèces pathogènes les plus fréquemment impliquées dans les bactériémies. Mais l'étude de quelques levures et d'une mycobactérie permet d'envisager également des perspectives à plus long terme dans le diagnostic des fongémies et celui des mycobactérioses.

Grâce à un traitement de données relativement simple appliqué aux réponses potentiométriques, une identification des micro-organismes a été réalisée dans des sangs humains provenant de 60 patients différents, infectés artificiellement avec 14 espèces bactériennes différentes. Le signal électrochimique a permis de connaître :

- Le Gram de la bactérie détectée, avec un TIC (Taux d'Identification Correcte) de 99 %, en 5 h 45 après positivité ;
- Le genre de la bactérie détectée, avec un TIC de 85 %, en 7 h 45 après positivité.

De plus, une identification à l'espèce semble envisageable avec une base de données plus conséquente.

Ce chapitre a donc été consacré à l'étude des signaux afin d'en tirer le maximum d'informations possible et de comparer cette méthode avec les analyses existantes. Cependant, les variations de potentiel utilisées ont une cause qui reste inconnue, nous savons uniquement que l'acidification du milieu ne permet pas de les expliquer totalement. Le chapitre suivant est donc consacré à la compréhension des phénomènes observés par potentiométrie.

Chapitre 4

Etude du phénomène observé par potentiométrie

Compte tenu des performances atteintes en termes d'identification, une partie de ce doctorat a été consacrée à l'amélioration du protocole de mesure et à l'acquisition d'une base de données conséquente. Une seconde partie du travail, présentée dans ce chapitre, a consisté en une étude des causes des profils potentiométriques spécifiques enregistrés et à la compréhension des phénomènes mis en jeu, en se concentrant sur une seule espèce bactérienne : *Escherichia coli*.

1. Influence des paramètres expérimentaux sur le signal mesuré

Afin de mieux saisir les causes des évolutions de potentiel observées lors d'une croissance bactérienne, l'influence de différents paramètres expérimentaux sur les signatures électrochimiques a été étudiée.

1.1. Influence du milieu de culture

Le milieu de culture (et donc le milieu de mesure) a été le premier paramètre expérimental à avoir été étudié. En effet, le métabolisme d'un micro-organisme est impacté par les nutriments disponibles dans le milieu dans lequel il évolue. Cinq milieux de culture ont été choisis pour cette étude :

- Un mélange BACT/ALERT® FA Plus + sang humain total, le milieu utilisé dans le **Chapitre 3** ;
- Un mélange BACT/ALERT® FA Plus + sang humain total qui a été incubé sans bactérie pendant 5 jours avant inoculation de bactéries ;
- Un mélange BACT/ALERT® FA Plus + sang de cheval défibriné (Thermo Scientific™) ;
- Le milieu de culture commercial BACT/ALERT® FA Plus (bioMérieux) seul ;
- Un milieu de culture commercial TSB (Tryptic Soy Broth – VWR).

La **Figure 4-1** présente les courbes en potentiel et la dérivée lissée associée d'une électrode de polyaniline, pendant une croissance d'*Escherichia coli*, dans chaque milieu de culture étudié.

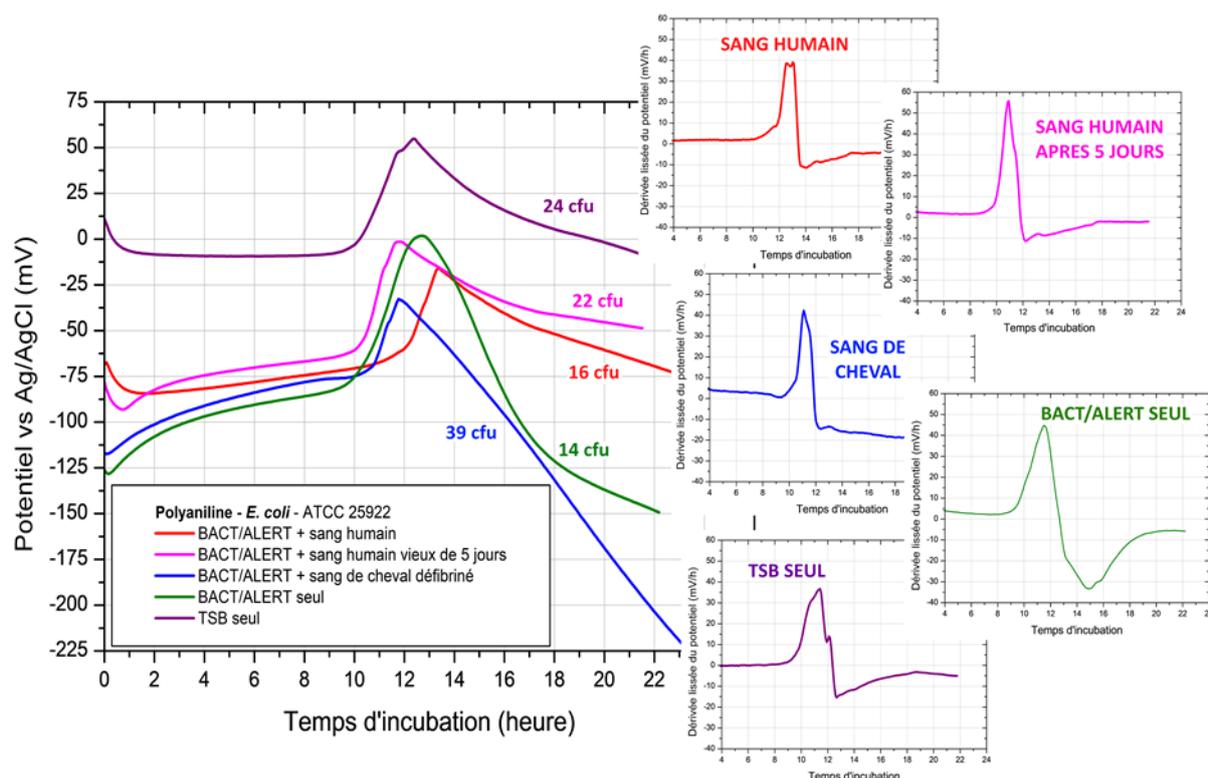


Figure 4-1 : Courbes potentiométriques et profils de dérivée lissée de potentiel pour une électrode de polyaniline, obtenues pendant une croissance d'*Escherichia coli*, dans 5 milieux différents (BACT/ALERT® + sang humain total, BACT/ALERT® + sang humain total vieilli 5 jours, BACT/ALERT® + sang de cheval défibriné, BACT/ALERT® seul, TSB seul), à 37°C et 90 rpm.

En utilisant le même critère de positivité que dans le **paragraphe 2.3.1 - Chapitre 3** (dérivée lissée supérieure à 7 mV/h), il est possible de calculer les temps de détection (TTP, pour *Time-To-Positivity*) obtenus pour chaque milieu de culture (**Tableau 4-1**).

Tableau 4-1 : Temps de détection (TTP), calculés à partir de la Figure 4-1, pour une croissance d'*E. coli* (ATCC 25922) dans différents milieux de culture.

Milieu de culture utilisé	Inoculum	TTP (heure)
Sang humain total + BACT/ALERT® FA Plus (« classique »)	16 cfu	11,4
Sang humain total + BACT/ALERT® FA Plus pré-incubé 5 jours	22 cfu	9,93
Sang de cheval défibriné + BACT/ALERT® FA Plus	39 cfu	10,4
BACT/ALERT® FA Plus	14 cfu	9,51
TSB	24 cfu	9,76

Le temps de doublement d'*Escherichia coli* est d'environ 20 minutes (22 minutes mesurées au laboratoire, par suivi de la densité optique à 550 nm sur la souche type ATCC 11775 dans le TSB à 37°C). Les inoculums choisis étant très proches (maximum un facteur 2 de différence) une différence de temps de détection largement supérieure à 20 minutes (donc 0,3 heure) indique des différences de fertilité entre milieux de culture.

Plusieurs conclusions peuvent donc être tirées du **Tableau 4-1** :

- L'ajout de sang dans le BACT/ALERT® FA Plus entraîne une diminution de la fertilité du milieu (perte d'environ 2 h).
- Un milieu de culture [BACT/ALERT® FA Plus + sang humain] pré-incubé permet une positivité plus précoce.
- Une hémoculture dans du sang de cheval défibriné se positive plus rapidement (dans ce cas) qu'une hémoculture sur sang humain total.

Pour une expérience « classique », le BACT/ALERT® FA Plus est à température ambiante (environ 20°C) et le sang à 4°C en début de mesure, on peut donc approximer la température du mélange de 30 mL de BACT/ALERT® FA Plus avec 10 mL de sang à 16°C. Pour atteindre la température optimale de croissance des bactéries (37°C) le milieu de culture doit donc subir une augmentation de sa température de 11°C.

Dans le cas d'une préincubation, une mise à température de l'ensemble du milieu (à 37°C) est effectuée pendant 5 jours, les bactéries sont donc inoculées dans un milieu à la température optimale. De plus, certains composés antibactériens naturellement présents dans le sang^{1,2} ont pu être dégradés pendant la préincubation³. La différence de temps de détection entre le milieu préincubé et le milieu « classique » peut s'expliquer en partie grâce à ces raisons.

Le sang de cheval défibriné, à la différence du sang total, est dépourvu de fibrinogène, une protéine potentiellement responsable de l'encrassement des électrodes⁴. Cette modification influe probablement sur la réduction du temps de détection mais d'autres traitements ont pu être appliqués au sang de cheval défibriné afin de limiter les variabilités entre inter-lots, améliorant également la fertilité de ce milieu.

Les conclusions du **paragraphe 4 - Chapitre 3** sont donc confirmées : nos valeurs de TTP sont comparables à celles obtenues par un automate commercial, dans des conditions plus favorables que celles utilisées dans nos expériences. Il semble donc que, à conditions égales, notre méthode de détection soit légèrement plus performante que les automates commerciaux.

Outre ces différences de TTP, on peut remarquer dans la **Figure 4-1** que les signatures potentiométriques (= les dérivées lissées du potentiel) diffèrent suivant le milieu de culture utilisé. De

telles courbes ne peuvent être utilisées dans notre processus d'identification (**paragraphe 5 - Chapitre 3**) sans en dégrader les performances. Afin d'étendre cette méthode à d'autres types de tests microbiologiques (dans de l'urine ou dans du liquide cérébro-spinal par exemple), il semble donc pertinent de développer des algorithmes milieu-dépendants, dans lesquels une classe d'apprentissage correspond à une espèce dans un milieu donné.

Cette extension de l'identification par apprentissage machine n'a pas été étudiée, pour des raisons de temps disponible. De plus, plusieurs limites sont à prendre en compte.

Espèce (et souche) unique.

L'objectif du travail expérimental exposé dans ce chapitre a été de développer des protocoles afin d'étudier les phénomènes mis en jeu pendant la détection potentiométrique de la croissance bactérienne. Dans ce but, l'utilisation d'une bactérie modèle *E. coli* a été ciblée. Les résultats obtenus sont donc à mettre en perspective avec cette limite. Pour confirmer l'absence de modification importante de la signature électrochimique pour différents milieux de culture, des expériences identiques sont donc nécessaires avec d'autres souches et espèces bactériennes.

Milieux de culture utilisés.

Les milieux proposés ont été choisis pour leur simplicité d'adaptation au protocole existant mais nous ne savons pas si ces changements sont suffisamment importants pour entraîner une modification significative du métabolisme de la souche testée.

Matériau d'électrode choisi.

Comme déjà expliqué dans le **Chapitre 3**, quatre matériaux d'électrodes de travail ont été testés. Les légères modifications des signaux enregistrés dans les différents milieux sont peut-être dues au changement de métabolites produits par la bactérie mais peuvent également être causées par la modification des propriétés électrochimiques du milieu.

Compte tenu des limites de ces expériences, il est difficile de déduire une conclusion générique quant à notre dispositif. Cependant, nous pouvons affirmer que, pour une bactérie modèle, les processus physico-chimiques à l'œuvre dans la détection et l'identification ne semblent pas être particulièrement altérés pour :

- Un changement de patient (**Chapitre 3**), chaque expérience sur du sang humain étant associée à un tube différent de sang et donc à un patient différent ;
- Une absence de sang (**Figure 4-1** – courbe BACT/ALERT® FA Plus), qui peut se rapprocher d'une très forte dilution (par exemple quelques gouttes de sang dans 30 mL de BACT/ALERT® FA Plus) ;
- Une absence de fibrinogène (**Figure 4-1** – courbe sang de cheval défibriné).

Ces conclusions, bien que partielles, tendent à confirmer la robustesse de la méthode développée.

1.2. Influence de l'agitation et de la température

Lors d'une hémoculture dans un même milieu de culture, une agitation est nécessaire pour conserver le milieu homogène en termes de concentration en nutriments et en oxygène. L'absence d'agitation entraînera une décantation du milieu de culture (phénomène observé expérimentalement). Les micro-organismes, au fond du flacon d'hémoculture, consommeront l'oxygène présent qui aura du mal à se renouveler, ce qui entraîne un retard dans la détection.

Une température contrôlée est également nécessaire pour une hémoculture rapide. Les pathogènes présents dans le sang d'un patient infecté se développant à la température du corps humain (36°C à 37°C), une température s'écartant de ces valeurs entraînera une augmentation du temps de croissance des micro-organismes.

La **Figure 4-2** représente les courbes potentiométriques d'une électrode de polyaniline, enregistrées pour une croissance d'une même souche d'*Escherichia coli*, dans des hémocultures sous différentes conditions de température et d'agitation.

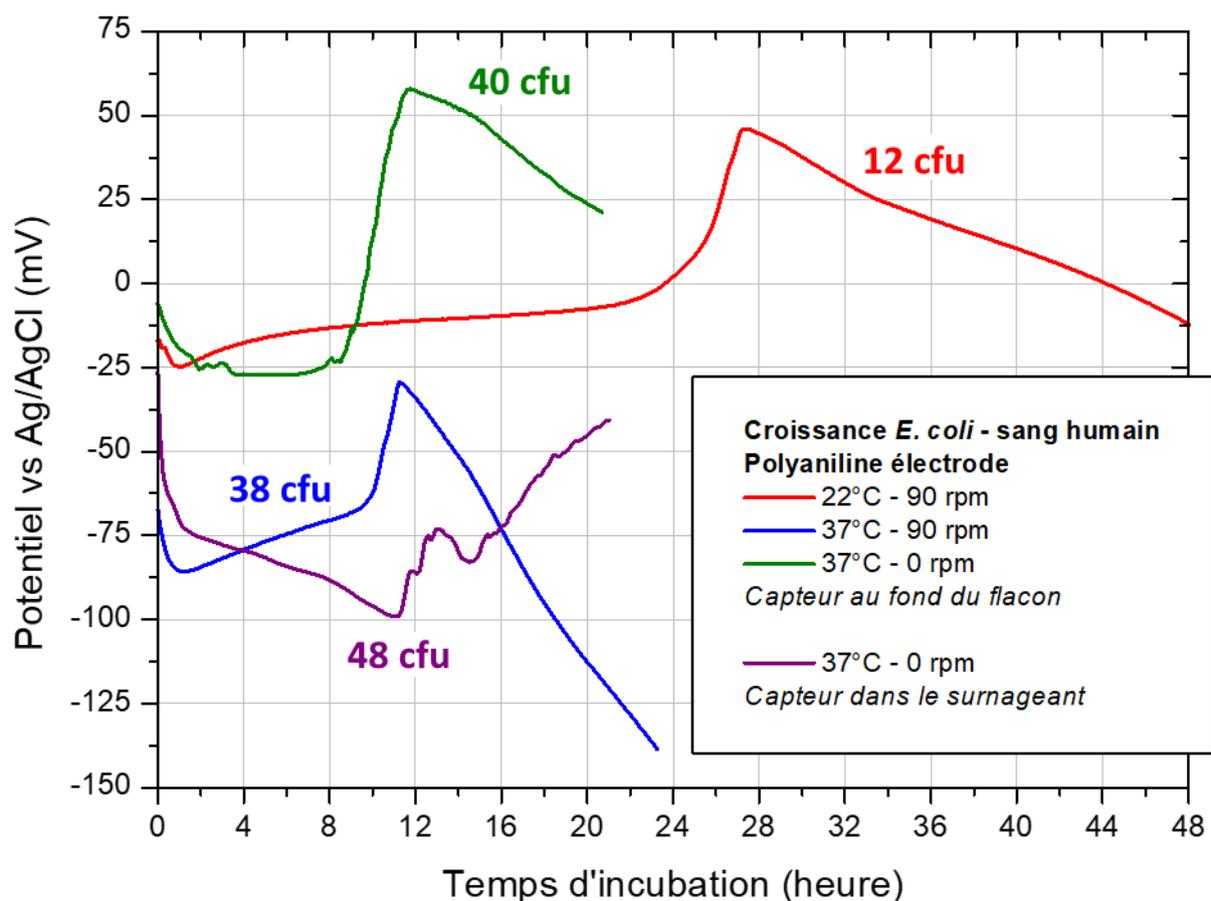


Figure 4-2 : Courbes potentiométriques d'électrodes en polyaniline pour des cultures d'*E. coli* (ATCC 8739) sous différentes conditions d'incubation (T° et agitation). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus.

1.2.1. Abaissement de la température de culture

On remarque clairement l'influence de la température (**courbe rouge** sur la **Figure 4-2**) sur le temps de détection. Une culture à 22°C présente un retard de détection de plus de 10 h par rapport à une culture « classique » à 37°C. La seconde phase de la courbe potentiométrique (la décroissance) est également plus lente pour la culture à 22°C. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est le ralentissement du métabolisme bactérien pour des températures basses⁵ pour cette souche (ATCC 8739) d'*E. coli*.

1.2.2. Suppression de l'agitation

L'absence d'agitation (**courbe verte** sur la **Figure 4-2**) ne semble pas entraîner un délai significatif dans la détection mais quelques modifications quant au profil de la courbe. Cette observation peut s'expliquer par le fait que notre capteur se trouve au fond du flacon d'hémoculture (**Figure 4-3 | Gauche**) : si nous détectons effectivement des métabolites produits par la bactérie, la sédimentation des micro-organismes sur les électrodes n'est pas un facteur limitant (au contraire).

Comme pour la culture à 22°C, la décroissance du potentiel, en deuxième partie de courbe, est plus lente que pour une culture avec agitation. Une explication possible est le ralentissement du métabolisme bactérien, ici dû à la raréfaction de l'oxygène et des nutriments⁵ à cause de la sédimentation.

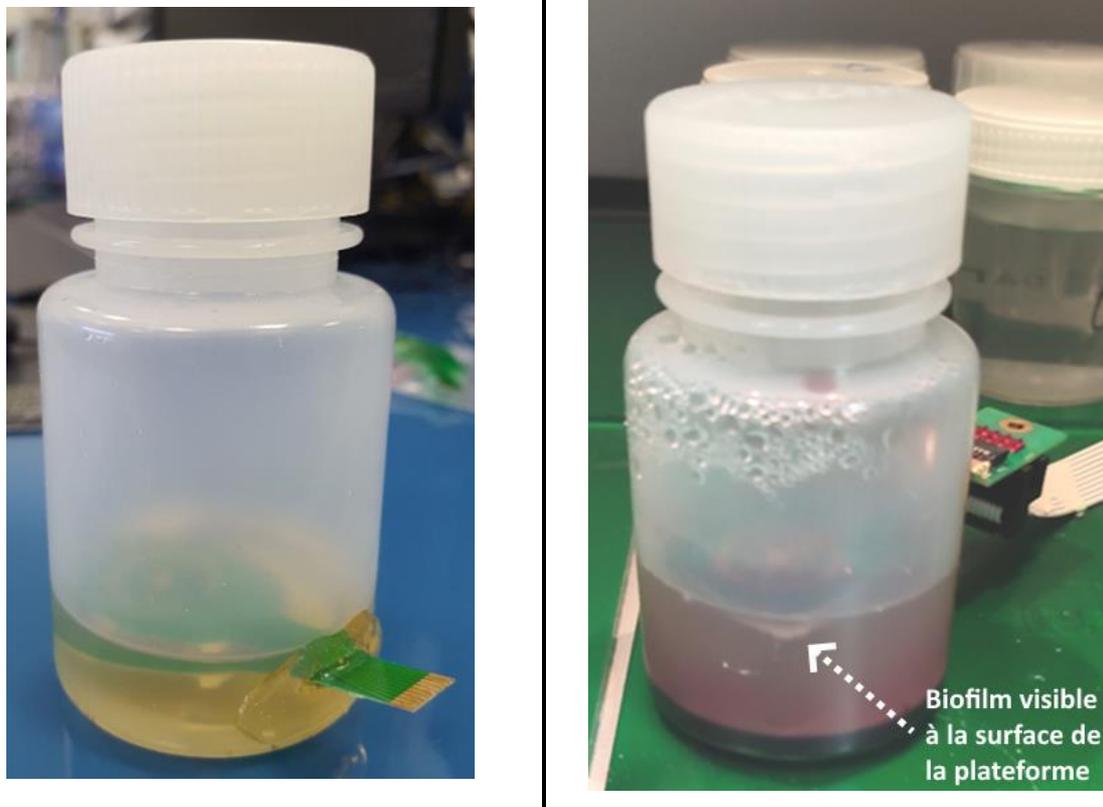


Figure 4-3 : (Gauche) Photo d'un flacon « classique », sans sang pour plus de visibilité, avec le capteur en position « au fond du flacon ». | (Droite) Photo du flacon utilisé pour une mesure potentiométrique dans le surnageant, sans agitation.

1.2.3. Mesure dans le surnageant

Une dernière expérience a été effectuée sans agitation (**courbe violette** sur la **Figure 4-2**). Le capteur est tout juste immergé dans le milieu de culture (face des électrodes tournée vers le fond du flacon), de cette façon les électrodes ne subissent pas l'effet de la sédimentation des micro-organismes (et des cellules sanguines) à leur surface (**Figure 4-3 | Droite**).

On obtient alors une courbe très différente, avec un profil méconnaissable qui se caractérise principalement par l'absence de décroissance du potentiel. La détection est plus lente (**11,2 h**) que pour les expériences où le capteur est placé au fond du flacon, que ce soit avec (**9,6 h**) ou sans agitation (**8,5 h**), alors même que l'inoculum est légèrement plus important.

Visuellement, le milieu est biphasique avec une couche sédimentée au fond du flacon et un surnageant translucide sur le reste de la hauteur du liquide (**Figure 4-3 | Droite**). Un biofilm bactérien est visible, à l'œil nu, sur la plateforme électrochimique.

La croissance de bactéries à la surface de l'électrode n'est pas celle rencontrée précédemment puisque, malgré l'absence d'agitation, un réservoir d'oxygène (le volume mort du flacon) est proche des micro-organismes. De plus, la sédimentation entraîne une consommation (au fond du flacon) d'une partie des nutriments mais également une production de CO₂ et de métabolites, molécules pouvant interagir avec l'électrode et les bactéries qui se multiplient à sa surface.

1.3. Influence de la surface d'électrode

La surface géométrique des électrodes et leur géométrie sont les derniers paramètres à avoir été étudiés quant à leur influence sur la détection de la croissance bactérienne. Afin de ne pas totalement changer notre méthode de mesure et le prototype fonctionnel utilisé, un changement de géométrie et une augmentation de la surface ont été réalisés en utilisant la **contre-électrode** de la plateforme en tant qu'**électrode de travail** (**Figure 4-4**), la méthode potentiométrique ne nécessitant pas un système à 3 électrodes.

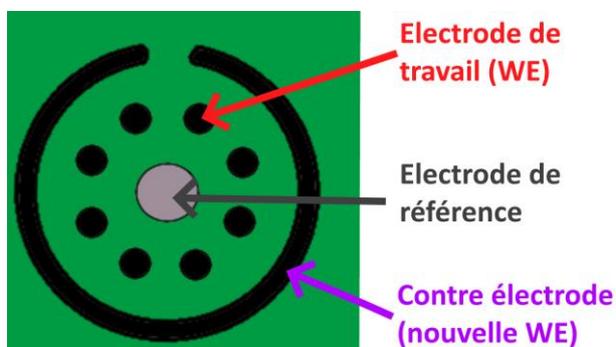


Figure 0-1 : Rappel visuel de la différence de taille et de géométrie entre une électrode de travail et la contre électrode sur la plateforme utilisée.

De cette façon, la surface d'une électrode peut être multipliée par un facteur 19 sans modifier la méthode de mesure. Quatre expériences ont été réalisées, une pour chaque matériau d'électrode, pour une croissance d'*E. coli* (ATCC 8739) dans un mélange BACT/ALERT® FA Plus + sang humain (**Figure 4-5**).

On peut remarquer un artefact sur la courbe du potentiel de l'électrode (standard) en encre carbone. Cette modification du potentiel, visible pendant 35 minutes (7 points de mesure), n'a pas été expliquée formellement mais est sans doute causée par un problème transitoire de mesure (bulle d'air sur l'électrode, mauvais contact à cause de l'agitation...).

Le potentiel d'abandon d'une électrode étant mesurée à courant nul, une augmentation de la surface n'influe pas, en théorie, sur la réponse potentiométrique. Cette indépendance de la mesure vis-à-vis de la surface géométrique de l'électrode est vérifiée d'après les courbes obtenues (**Figure 4-5**). L'augmentation de la surface d'électrode par un facteur 19 n'est donc pas suffisamment significative pour perturber les phénomènes biologiques mis en jeu, permettant une détection indépendante de la taille de l'électrode (au-delà de 3 mm²).

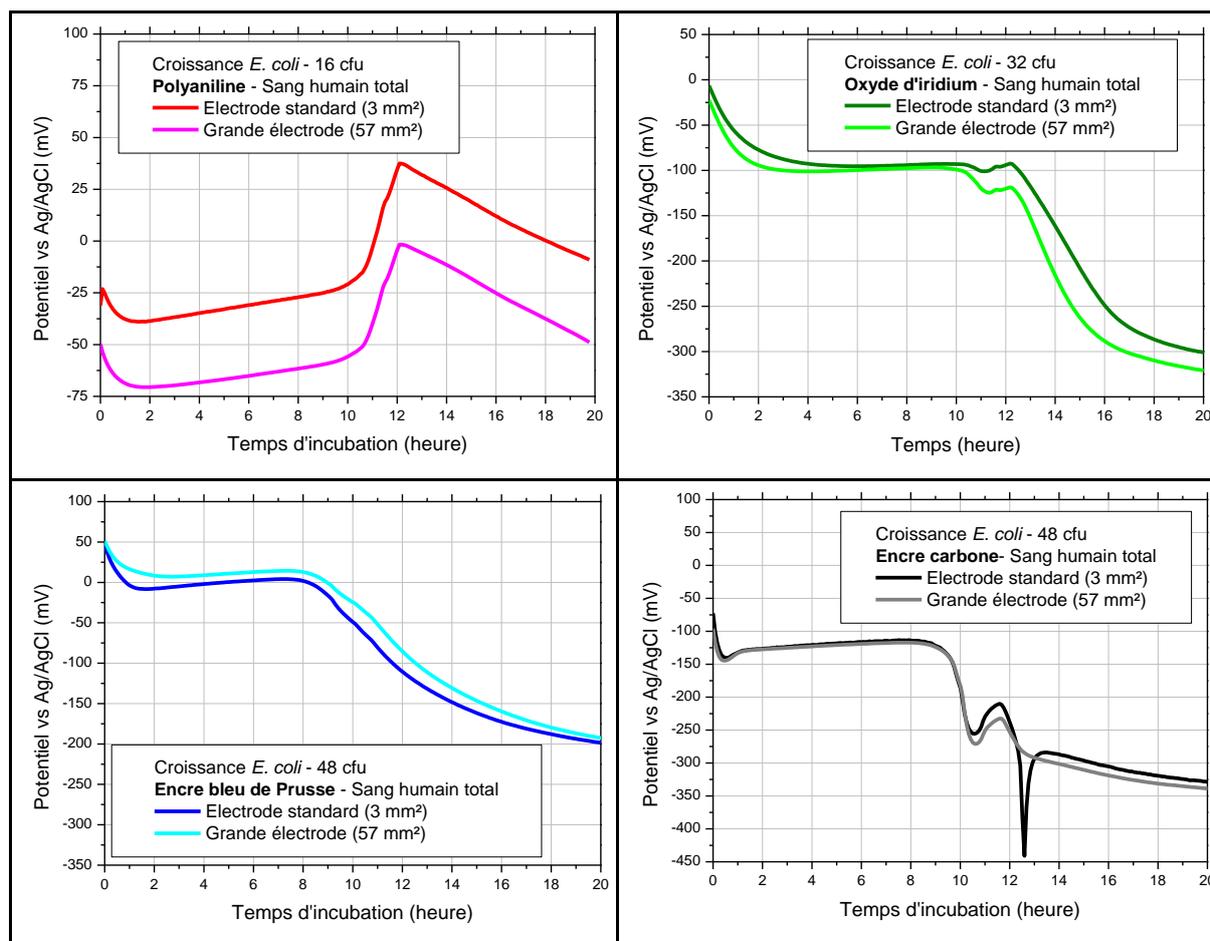


Figure 4-5 : Comparaison des courbes potentiométriques, pour chaque matériau, entre une électrode standard et une électrode à grande surface (augmentation d'un facteur 19) pendant une croissance d'*Escherichia coli* (ATCC 8739). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

2. Hypothèse de la détection d'un biofilm bactérien

Après plusieurs expériences pour comprendre la nature du phénomène détecté par la méthode présentée dans cette thèse, l'hypothèse de la création d'un biofilm (éventuellement électroactif) à la

surface des électrodes est vraisemblablement à l'origine de la signature potentiométrique observée. En effet, dans une telle structure microbienne, de nombreuses réactions électrochimiques sont présentes pour assurer la communication entre les cellules⁶.

Grâce à différentes stratégies, telles que l'utilisation de « navettes électroniques^{7,8} » ou de nano-fils⁹, certaines espèces bactériennes réussissent à assurer un transfert d'électrons entre leur biofilm et une électrode. Ces réactions sont couramment étudiées dans le domaine des biopiles microbiennes mais la détection de biofilms intéresse également le secteur de la santé, notamment pour le suivi de plaies cutanée (effectué par mesure du pH^{10,11}).

Un article récent de Poma *et al.* rapporte de plus une utilisation de la potentiométrie pour détecter la formation de biofilms bactériens à la surface d'électrodes de graphène fonctionnalisé¹².

L'hypothèse de la création d'un biofilm à la surface de nos électrodes pendant la croissance bactérienne semble donc pertinente à étudier.

2.1. Mesures potentiométriques avec filtration par diffusion

2.1.1. Objectifs de l'expérience

La première hypothèse formulée pour tenter d'expliquer les courbes de potentiel présentées dans ce manuscrit concernait la détection de métabolites redox, produits par les bactéries puis libérés dans la solution, conjointement à une acidification engendrée par la respiration bactérienne.

Afin de vérifier cette hypothèse, un protocole a été mis en place pour enregistrer l'évolution de potentiel des électrodes dans un milieu biologique où des bactéries se multiplient mais sans la présence de micro-organismes à la surface des électrodes. Une filtration, en continu, du milieu de mesure est donc nécessaire afin d'obtenir un milieu stérile mais avec les éventuelles molécules produites par une croissance bactérienne.

Le prototype de flacon compartimenté, développé avec l'aide du doctorant Stephan Pissot, a permis de remplir cette fonction. Une membrane poreuse hydrophile en polytétrafluoroéthylène (JGWP04700, Merck Millipore®) est placée au milieu d'un flacon. La taille des pores (0,2 µm) est choisie pour assurer une imperméabilité aux cellules : il s'agit en effet d'une taille de pores communément choisie pour la stérilisation par filtration. Chaque compartiment est composé d'un mélange [BACT/ALERT® + sang humain total] mais un seul des compartiments estensemencé avec une suspension bactérienne.

Un dispositif de mesure électrochimique est placé dans chacun des compartiments, via un bouchon instrumenté, permettant ainsi la mesure potentiométrique des deux milieux. Le flacon est placé à 37°C

sous agitation à 60 rpm, une trop grande agitation entraînant un débordement et donc une contamination du compartiment qui doit rester stérile. Cette faible agitation a tout de même un désavantage : elle ne permet pas d'obtenir des milieux homogènes, entraînant des courbes légèrement bruitées (voir **paragraphe 1.2 - Chapitre 4**). Le schéma explicatif de ce protocole est présenté en **Figure 4-6**.

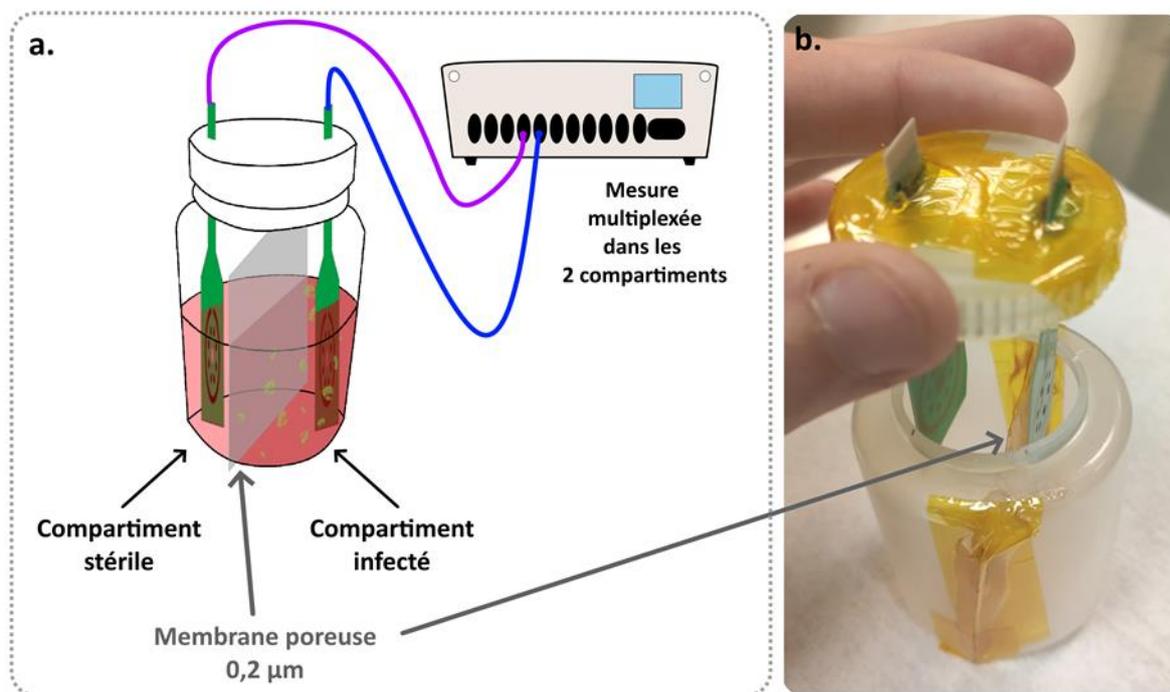


Figure 4-6 : Schéma explicatif (a.) et photo (b.) du prototype de flacon compartimenté permettant une mesure électrochimique duale de la signature potentiométrique des bactéries inoculées dans un compartiment contaminé et la détection d'espèces redox ou de variations de pH dans un compartiment stérile.

2.1.2. Résultats

Comme montré au **paragraphe 1.3 - Chapitre 3**, une croissance bactérienne d'*Escherichia coli* engendre une acidification du milieu d'environ 1 unité pH en 27 h, dans du sang de cheval défibriné avec perturbation régulière du milieu et sans mesure entre 12 h 30 et 27 h d'incubation (l'acidification de 1 unité pH est donc probablement plus précoce).

Le flacon compartimenté utilisé dans cette partie est muni d'une membrane dont les pores sont suffisamment petits pour interdire le passage des bactéries, mais suffisamment grands pour permettre la diffusion de molécules sécrétées par les bactéries et d'ions hydroniums. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux évolutions des potentiels des électrodes de polyaniline et d'oxyde

d'iridium, les seuls matériaux testés capables de détecter un changement de pH et, en présence de bactéries, d'afficher un profil particulier de potentiel.

L'intérêt de cette expérience est le comportement potentiométrique des électrodes situées dans le compartiment stérile. Les résultats envisagés et les conclusions associées sont répertoriés dans le **Tableau 4-2**.

Tableau 4-2 : Résultats possibles concernant les signaux potentiométriques enregistrés dans le compartiment stérile et leurs conclusions associées.

Réponses	Conclusions
Aucune évolution de potentiel.	Aucun métabolite redox n'a diffusé dans le compartiment stérile <i>Ou</i> : les pores de la membrane sont obstrués par un biofilm.
Mêmes profils qu'avec bactéries	Des molécules redox, produites par les bactéries et circulant à travers la membrane, sont à l'origine des profils potentiométriques
Augmentation du potentiel correspondant à la chute du pH.	La membrane ne laisse passer que les hydroniums, les molécules redox à l'origine des profils potentiométriques ne peuvent pas atteindre les électrodes du compartiment stérile.
	Les molécules redox à l'origine des profils potentiométriques ne sont pas présentes en solution (ou pas en suffisamment grande concentration).
Autre évolution.	D'autres composés chimiques sont détectés et passent la membrane, peut-être uniquement quelques-uns à l'origine des profils potentiométriques visibles dans le Chapitre 3 .

Comme le montre la **Figure 4-7**, bien que les bactéries prolifèrent d'un côté de la membrane (entraînant des courbes potentiométriques semblables à celles évoquées en **Chapitre 3**), les électrodes de l'autre côté de la membrane ne présentent pas les mêmes évolutions de potentiel. A la place d'un profil bruité mais reconnaissable, les potentiels de la polyaniline et de l'oxyde d'iridium augmentent puis se stabilisent, avec un retard temporel sur les perturbations enregistrées dans le compartiment infecté. La stérilité du compartiment non inoculé a été contrôlée et validée par culture sur boîtes de Petri.

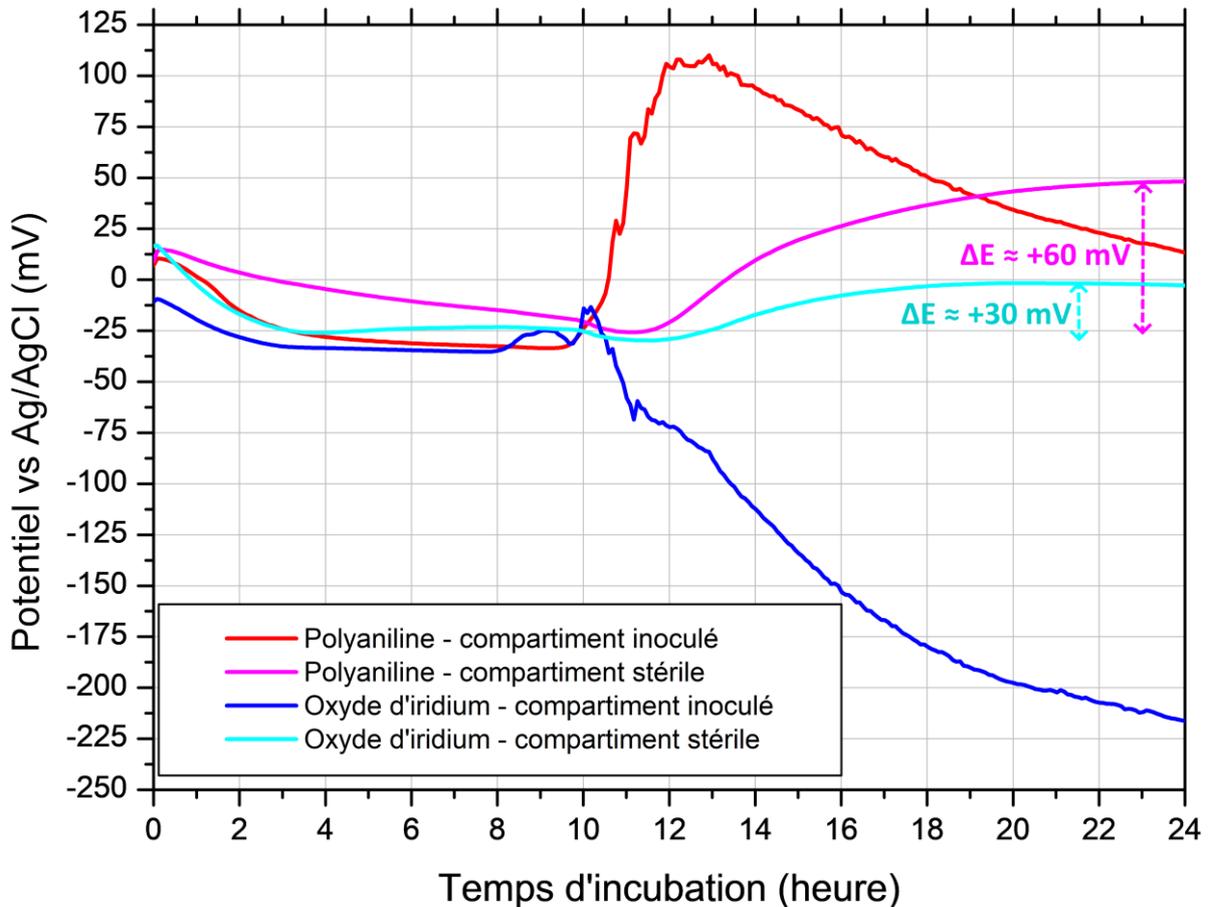


Figure 4-7 : Courbes potentiométriques des électrodes en polyaniline et en oxyde d'iridium placées dans deux compartiments : l'un avec croissance d'*E. coli* (ATCC 25922) et l'autre stérile. Hémoculture de sang humain dans le Bact/ALERT® FA Plus, 37°C, 60 rpm.

Les potentiels enregistrés dans le compartiment stérile présentent une augmentation d'environ 69 mV pour la polyaniline et d'environ 30 mV pour l'oxyde d'iridium. Or, nous connaissons les sensibilités aux variations de pH pour ces deux matériaux d'électrodes (**paragraphe 3.2.1 - Chapitre 2**), il est donc possible de calculer la variation de pH détectée par ces deux matériaux :

- Polyaniline. $\Delta\text{pH}_{\text{PANI}} = \frac{69 \text{ mV}}{\text{Sensibilité}_{\text{PANI}}} = \frac{69}{-64} \approx -1,1 \text{ unité pH}$
- Oxyde d'iridium. $\Delta\text{pH}_{\text{IrOx}} = \frac{30 \text{ mV}}{\text{Sensibilité}_{\text{IrOx}}} = \frac{30}{-54} \approx -0,56 \text{ unité pH}$

Une acidification du milieu est détectée par les électrodes du compartiment stérile mais son amplitude diffère suivant le matériau d'électrode utilisé. Il paraît clair que, bien que les valeurs calculées s'écartent de celle trouvée en **paragraphe 1.3.2.2 - Chapitre 3** dans du sang de cheval défibriné, les molécules détectées dans le compartiment infecté ne sont pas retrouvées dans le compartiment stérile.

Le décalage en temps (entre les deux compartiments) pour observer des variations de potentiel importantes peut s'expliquer par l'hétérogénéité du milieu de mesure, hétérogénéité induite par la faible agitation dans cette expérience. De plus, la chute du potentiel des deux matériaux d'électrodes n'est pas observée dans le compartiment stérile : ce comportement serait donc dû à la présence des bactéries au voisinage des électrodes.

En observant la turbidité des deux compartiments à $t_{\text{incubation}} = 18$ h, un peu de milieu du compartiment infecté (alors très concentré en *E. coli*) a contaminé le compartiment stérile. La mesure se poursuivant, nous obtenons la **Figure 4-8** : la croissance bactérienne est détectée quelques heures après la contamination, suivant des profils potentiométriques très similaires à ceux observés dans les expériences « classiques ».

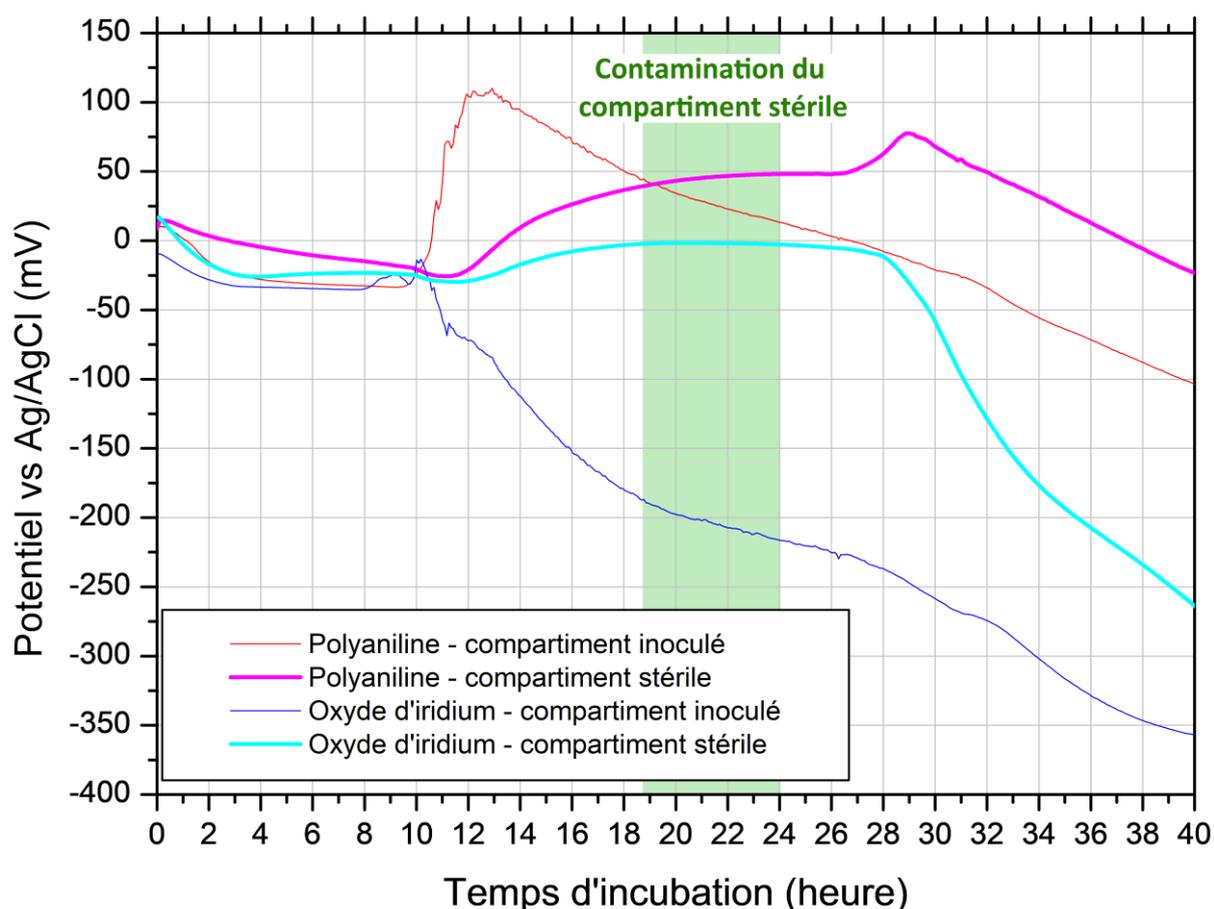


Figure 4-8 : Courbes potentiométriques des électrodes en polyaniline et en oxyde d'iridium placées dans le compartiment stérile après contamination par *E. coli* (ATCC 25922). Hémoculture de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 60 rpm.

De plus, les courbes ainsi obtenues sont moins bruitées que celles du compartiment infecté initialement, ce qui interroge sur la qualité de la mesure dans un environnement légèrement plus acide

par rapport à un mélange classique [BACT/ALERT® + sang humain total]. Ce changement de milieu n'a pas été étudié par manque de temps.

2.1.3. Hypothèse concernant le fonctionnement de notre détection

Puisque les métabolites bactériens générés par *E. coli* sont de taille suffisamment faible pour circuler dans les pores de 0,2 µm de la membrane, l'observation de la **Figure 4-7** réfute donc une hypothèse : *les profils potentiométriques, ces empreintes électrochimiques permettant une identification, ne sont pas causés par des molécules secrétées en solution par les bactéries pendant la croissance.*

Les molécules détectées dans le compartiment infecté seraient donc situées au voisinage des électrodes sans être libérées dans la solution car confinées par un biofilm : notre méthode agirait plus précisément comme un capteur de croissance de biofilm bactérien à la surface des électrodes. Les dernières semaines d'expérimentation ont donc été consacrées à la mise en évidence d'un éventuel biofilm bactérien, notamment grâce à des mesures de spectroscopie d'impédance et à des observations par microscopie.

2.2. Etude par spectroscopie d'impédance

2.2.1. Objectifs de l'expérience

Comme expliqué au **paragraphe 2.2 - Chapitre 2**, la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) est une méthode d'analyse permettant l'étude des interfaces électrochimiques. On peut séparer l'utilisation de l'EIS en deux principes dont chacun présente des avantages et des limites (**Tableau 4-3**).

Dans un premier temps notre objectif a été d'observer qualitativement la croissance d'un biofilm sur nos électrodes, la **méthode sans sonde redox** semble donc plus appropriée mais également plus simple à mettre en œuvre.

Pour chaque matériau d'électrode, les évolutions de l'impédance pendant une croissance bactérienne et pour une expérience négative sont enregistrées. Une augmentation de l'impédance de nos électrodes en présence de bactéries indiquerait la présence d'une épaisseur de matériel biologique réduisant le transfert de charges : un biofilm bactérien.

Tableau 4-3 : Principes envisagés pour l'étude par spectroscopie d'impédance du comportement du dispositif développé.

	Ajout d'une sonde redox dans le milieu	<u>Méthode sans sonde redox</u>
Principe	Mesure au potentiel de la sonde → permet de suivre sa présence ou son absence au voisinage de l'électrode	Mesure au potentiel d'abandon (mesuré) de l'électrode.
Avantages	Etude du transport de matière à la surface de l'électrode (moins la sonde est détectée plus le biofilm est épais).	Pas de modification du potentiel de l'électrode.
		Pas de modification du milieu.
		Principe similaire à la détection potentiométrique.
Limites	L'ajout de la sonde peut modifier la croissance bactérienne ¹³ .	Permet une analyse qualitative mais pas quantitative de l'évolution de l'impédance.
	Imposition d'un potentiel à l'électrode.	
	La mesure est précise mais notre milieu est très complexe → exploitation des résultats difficile.	

Le protocole de mesure ne demande pas de flacon particulier mais, s'agissant d'une méthode dynamique (à différentes fréquences), les dispositifs utilisés possèdent une contre-électrode, ici en encre carbone. Le potentiostat Autolab PGSTAT128N utilisé pendant toutes les expériences précédentes n'est pas outillé pour la mesure d'impédance, nous avons donc choisi un potentiostat PalmSens4 (PalmSens), piloté par le logiciel PSTrace. Un multiplexeur (MUX8-R2, PalmSens) est également ajouté au système, comme pour la mesure potentiométrique classique.

Une succession de mesures est effectuée suivant un ordre précis (**Figure 4-9**) afin de faire correspondre les valeurs d'impédance et la détection potentiométrique.

Pour les électrodes impaires, le potentiel d'abandon (OCP) est mesuré en premier afin de connaître sa valeur. La mesure d'impédance s'effectue ensuite à l'OCP avec une amplitude de 10 mV_{RMS} et un balayage en fréquence de 100 kHz à 0,1 Hz.

Un problème de connectique ayant engendré des mesures totalement bruitées à hautes fréquences, l'ensemble des graphiques suivant ont été réalisés en limitant l'analyse des spectres mesurés dans la gamme de fréquence 0,1 - 1000 Hz.

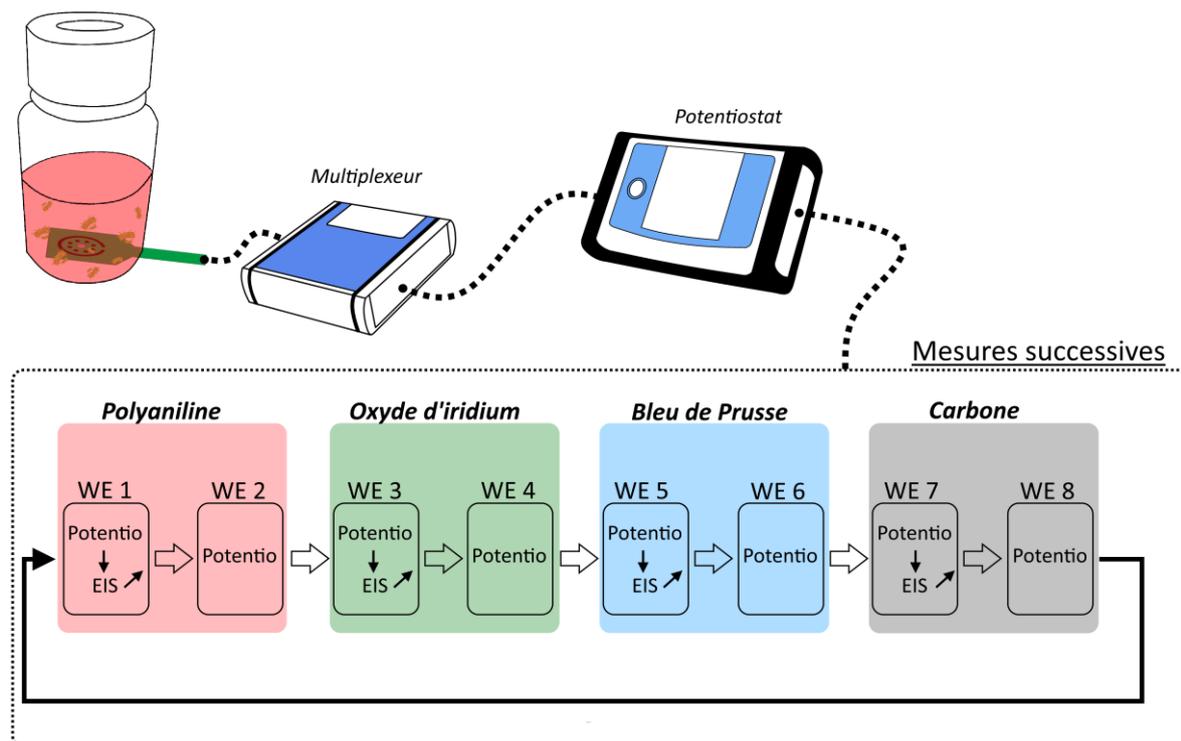


Figure 4-9 : Processus de mesure pour les flacons utilisant la spectroscopie d'impédance (Potentio = mesure potentiométrique, EIS = spectroscopie d'impédance). Grâce au multiplexeur les mesures sont successives. Une seule électrode de chaque matériau est utilisée pour les mesures d'impédances, ceci permet d'étudier l'influence de cette mesure sur la détection par potentiométrie.

L'utilisation de ce type de potentiostat a nécessité une culture en dehors de l'incubateur Infors classique (passe-câbles trop petit pour les câbles du PalmSens4). La croissance bactérienne est donc perturbée par rapport à une culture classique :

- i. La culture se fait à température ambiante du laboratoire (non contrôlée, pouvant varier de 18°C à 23°C) ;
- ii. L'agitation, assurée par un agitateur orbital VXR basic Vibrax®, est moins précise que celle de l'Infors (dans ce cas l'agitation est d'environ 100 rpm).

Des études plus précises et rigoureuses seront donc nécessaires pour approfondir les résultats présentés ci-dessous.

2.2.2. Résultats et discussion

2.2.2.1. Impact de la mesure EIS sur la détection

Le premier résultat d'intérêt de cette expérience est l'étude de l'impact d'une mesure d'impédance régulière sur la réponse potentiométrique des électrodes. En effet, si la mesure d'impédance modifie

notre mesure de potentiel, il sera difficile voire impossible de relier les résultats d'impédance à la détection de la croissance bactérienne.

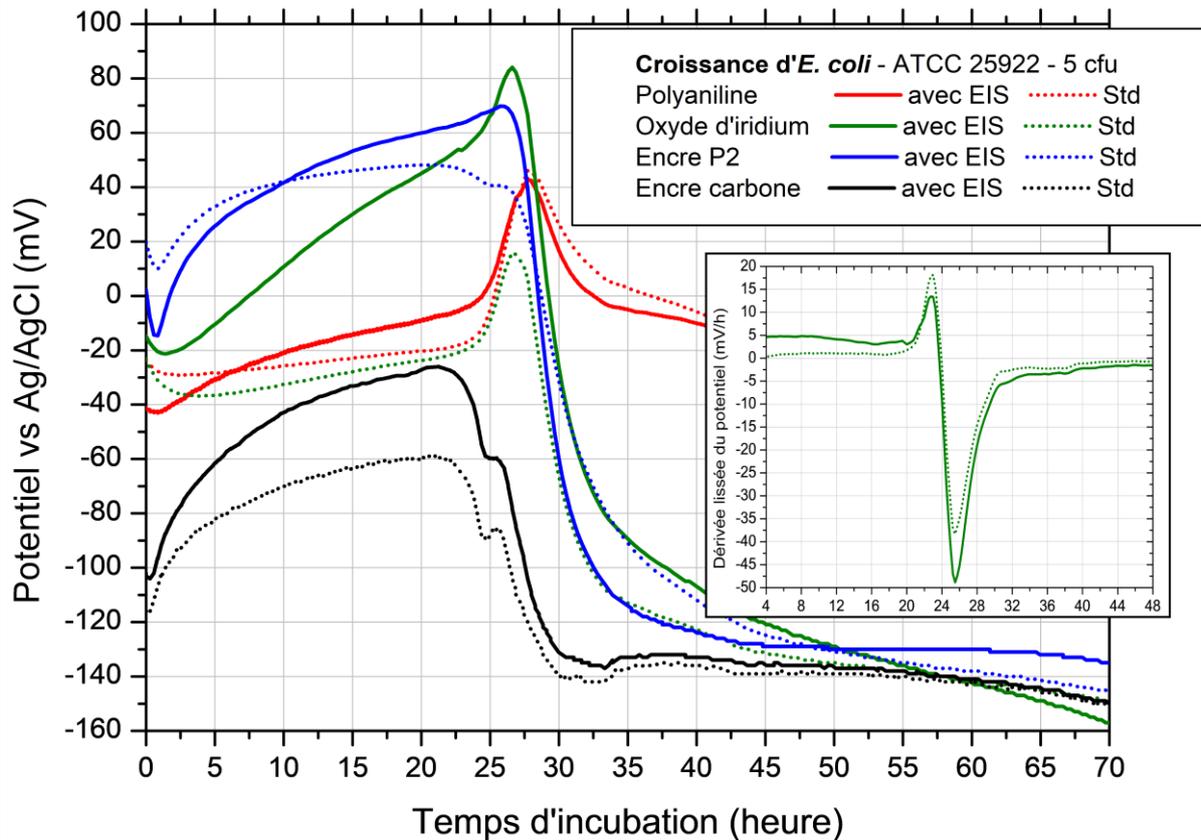


Figure 4-10 : Courbes potentiométriques obtenues pour une croissance d’*E. coli*, avec et sans mesure d’impédance avant la mesure du potentiel. Hémoculture de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 20°C, 100 rpm. | Encadré : Courbes de dérivées lissées du potentiel des électrodes d’oxyde d’iridium.

Compte tenu des résultats obtenus en début de chapitre, nous savons qu’une modification de l’agitation et de la température d’incubation peut perturber légèrement les profils des chronopotentiogrammes. Les modifications des courbes visibles en **Figure 4-10**, par rapport aux courbes habituellement présentées (au **Chapitre 3** notamment), sont donc probablement dues aux conditions dégradées de la croissance et de la mesure.

De plus, la mesure d’impédance ne semble pas impacter fortement les évolutions des potentiels des quatre matériaux d’électrodes, à l’exception de l’oxyde d’iridium. On remarque en effet une dérive importante du potentiel jusqu’à la détection, pour l’électrode ayant subi les mesures EIS. Cependant, cette dérive ne modifie pas significativement le profil de la dérivée lissée du potentiel, signal d’intérêt pour la détection (encadré de la **Figure 4-10**).

Nous avons donc considéré que, pour tous les matériaux d'électrodes utilisés, les résultats des mesures d'impédance sont représentatifs des phénomènes (chimiques et biologiques) mis en jeu en l'absence de ces mesures.

2.2.2.2. Evolution de l'impédance pendant la croissance : le cas de la polyaniline

La polyaniline est le matériau d'électrode qui a été le plus étudié pendant ce doctorat, principalement pour sa capacité à correctement identifier les espèces bactériennes par potentiométrie. C'est pourquoi je me suis intéressé particulièrement aux résultats obtenus par EIS sur ce matériau.

La **Figure 4-10** nous indique que la plage temporelle de détection, c'est-à-dire le moment où les fortes variations de potentiel et donc de dérivées sont observées, se situe entre 20 h et 30 h d'incubation pour la polyaniline, avec un maximum de potentiel à 25 h. Logiquement, les évolutions d'impédance les plus significatives devraient s'effectuer pendant ces dix heures.

Comme expliqué précédemment, les choix concernant le protocole de mesure impliquent une étude qualitative de l'impédance : l'observation d'une évolution « significative » nécessite donc une comparaison avec une absence d'évolution « significative ». Une expérience négative (sans croissance bactérienne) a donc été effectuée afin de se comparer à l'évolution « naturelle » de l'impédance de l'électrode dans le milieu de culture [BacT/ALERT® FA Plus + sang humain].

La **Figure 4-11** présente les variations des diagrammes de Nyquist de l'expérience positive et l'expérience négative, pour différents temps d'incubation.

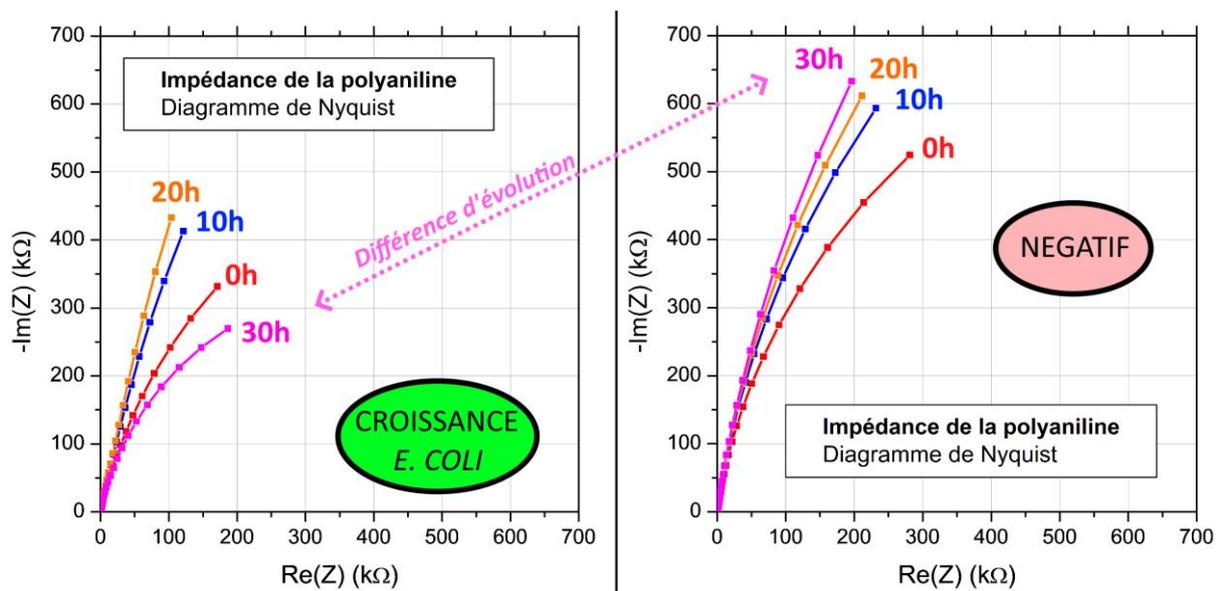


Figure 4-11 : Evolution des diagrammes de Nyquist (entre 1 kHz et 0,1 Hz) pour la polyaniline pendant la croissance d'*E. coli* et pendant un négatif. Un graphe est tracé toutes les 10 h. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 20°C, 100 rpm.

On remarque en premier lieu que les valeurs d'impédance sont différentes entre l'expérience positive et l'expérience négative dès le début de l'incubation (**courbe rouge**). Ces différences peuvent s'expliquer par la méthode de dépôt et donc l'épaisseur des matériaux d'électrodes non-maîtrisée entre deux capteurs.

De plus, l'impédance de la polyaniline ne fait que croître dans l'expérience négative (probablement à cause d'une adsorption de protéines¹⁴) contrairement à l'expérience positive (la croissance d'*E. coli*) où on observe une chute brutale de l'impédance entre 20 h et 30 h d'incubation. Cette chute confirme la plage temporelle d'intérêt de l'impédance, trouvée par potentiométrie.

Pour observer plus précisément ce phénomène, la **Figure 4-12** se concentre donc uniquement sur ces dix heures d'intérêt (entre 20 h et 30 h d'incubation).

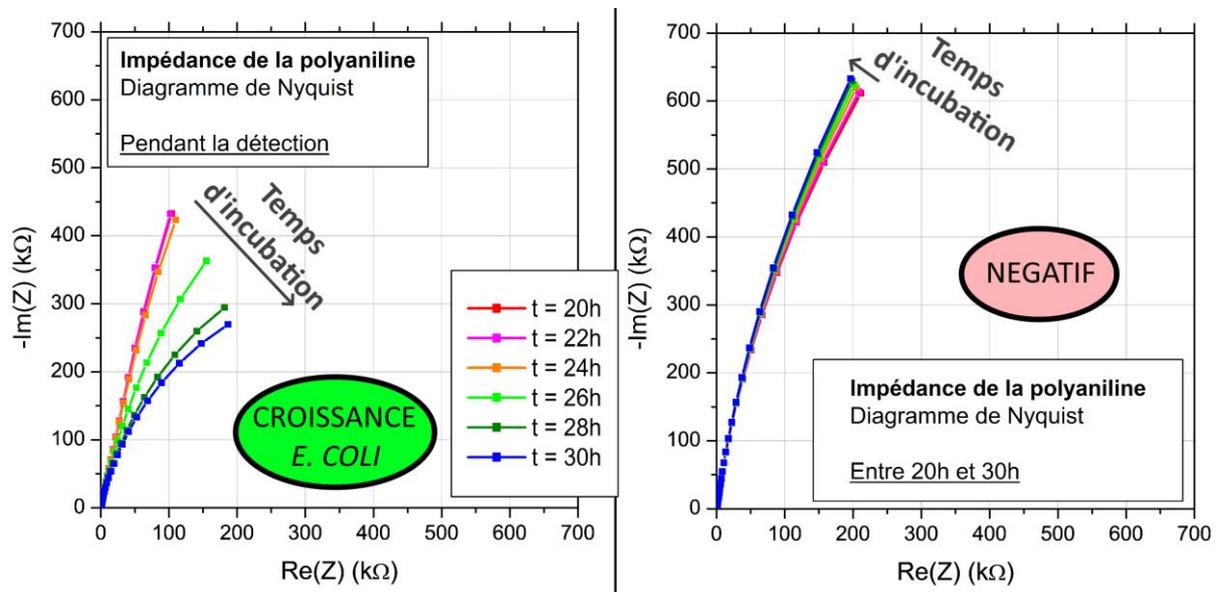


Figure 4-12 : Evolution des diagrammes de Nyquist (entre 1000 Hz et 0,1 Hz) pour la polyaniline pendant la croissance d'*E. coli* et pendant un négatif. Un graphe est tracé toutes les 2 h entre 20 h et 30 h d'incubation. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 20°C, 100 rpm.

On observe bien une chute progressive de la partie imaginaire de l'impédance couplée à une augmentation de la partie réelle à partir de $t_{\text{incubation}} = 24$ h pour l'expérience positive alors que l'impédance reste stable pour l'expérience négative.

Ce comportement pourrait effectivement confirmer notre hypothèse : un biofilm se crée à la surface de l'électrode (augmentation de l'impédance pendant les 20 premières heures) puis, les bactéries situées au confinement de l'électrode produisent des molécules électroactives, détectées par potentiométrie, qui entraînent la diminution de l'impédance, visible en **Figure 4-12**.

La plage temporelle correspondant à la détection de la croissance bactérienne par potentiométrie est la même que celle où l'impédance varie fortement. En revanche, nous n'avons pas encore défini la

plage fréquentielle pertinente pour étudier les phénomènes biologiques et chimiques à l'interface de nos électrodes.

Le choix d'une ou plusieurs fréquences particulières permet également de simplifier le traitement de données et la visualisation des évolutions de l'impédance. En effet, le protocole de mesure choisi a permis d'enregistrer l'impédance toutes les 16 minutes (pour chaque matériau d'électrode) pendant plus de 2 jours d'incubation : la quantité de graphiques est trop importante pour être représentée.

J'ai décidé de m'intéresser à la fréquence où les évolutions du module et de la phase de l'impédance sont les plus importantes. La **Figure 4-13** représente les diagrammes de Bode (module et phase de l'impédance) de la polyaniline en fonction de la fréquence de mesure et au cours du temps d'incubation (un point toutes les deux heures d'incubation).

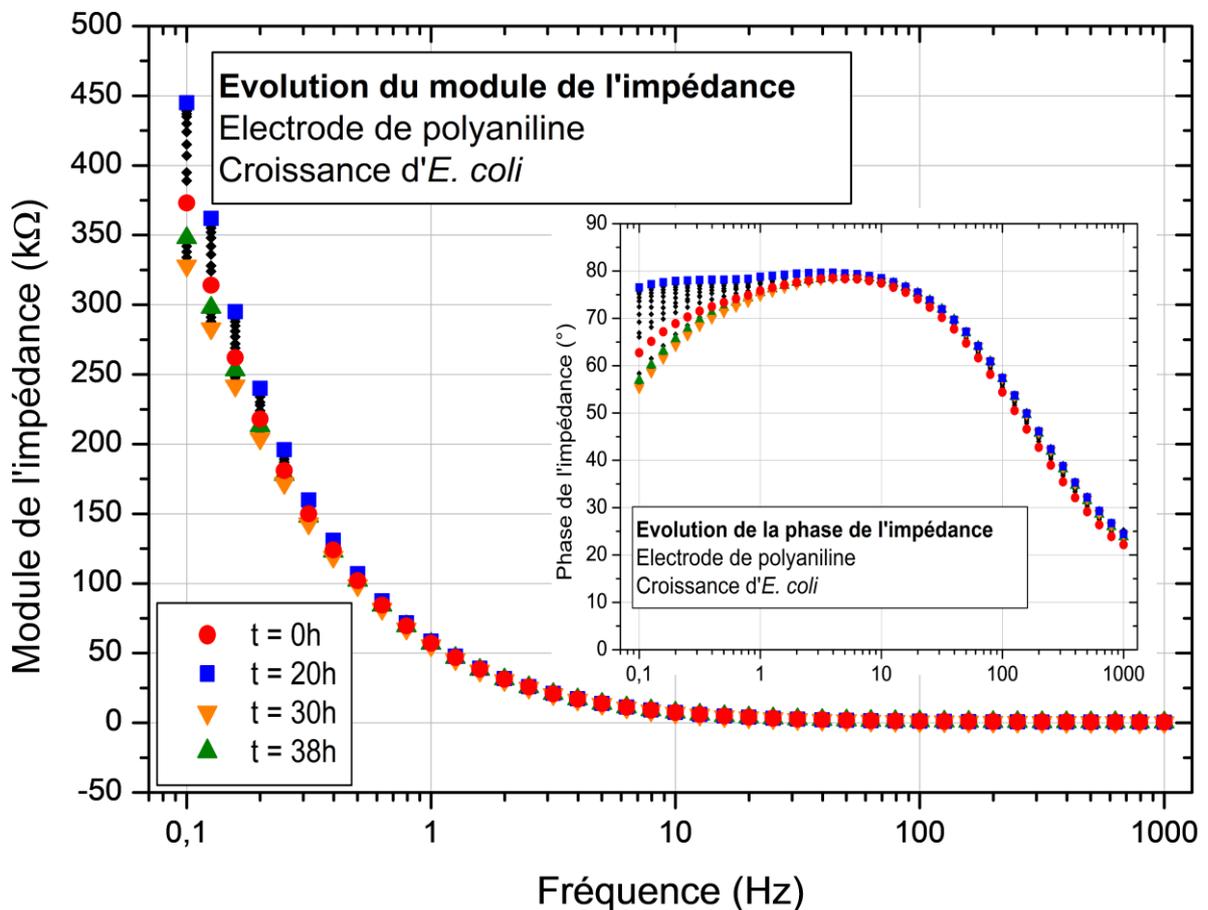


Figure 4-13 : Diagrammes de Bode de l'électrode de polyaniline en fonction de la fréquence de mesure (entre 0,1 et 1 kHz), pendant la croissance d'*E. coli* (un point toutes les 2 heures, focus sur 4 instants temporels précis). Hémoculture de sang humain dans le Bact/ALERT® FA Plus, 20°C, 100 rpm.

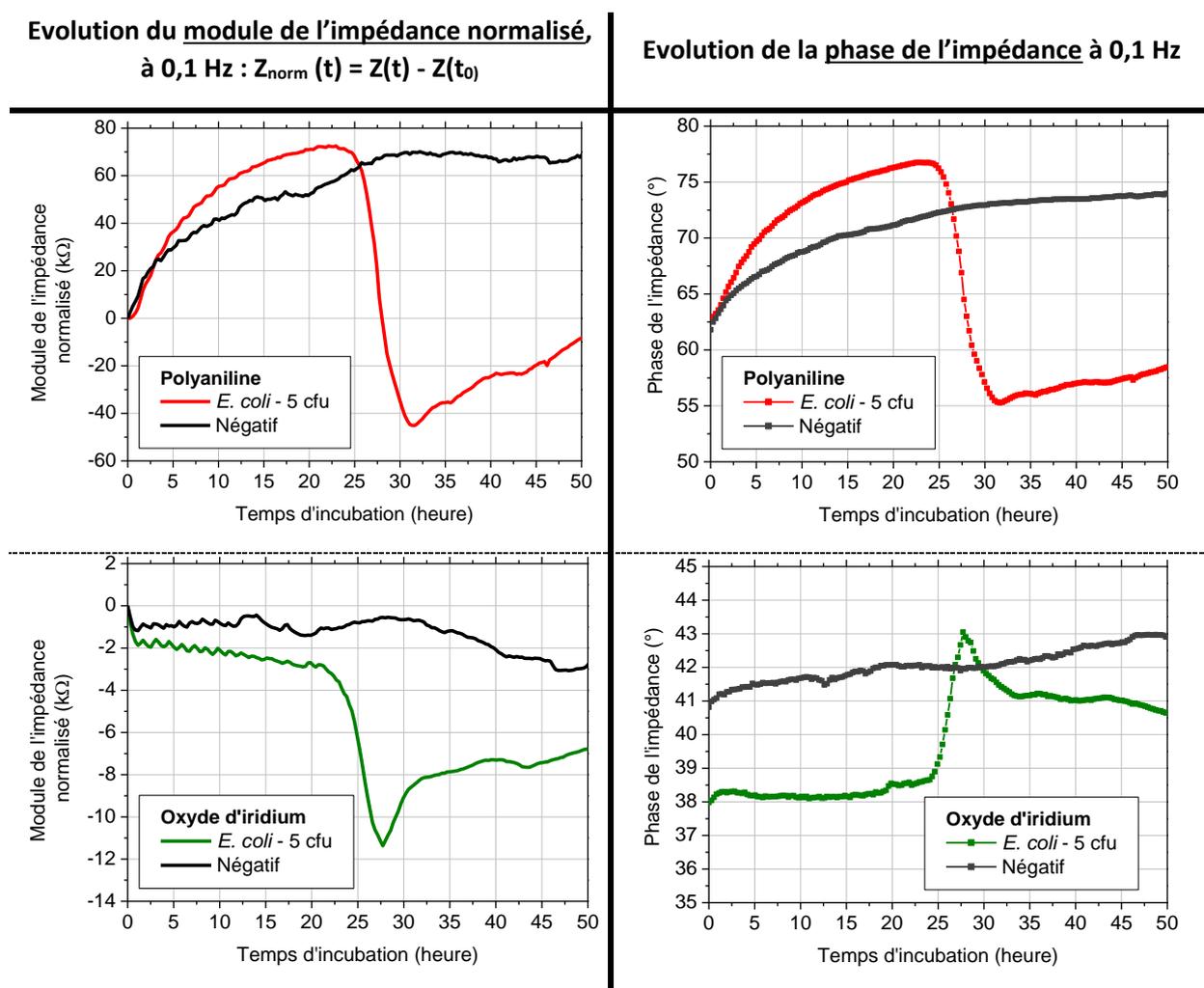
On remarque que les plus fortes variations d'impédance (module et phase) ont lieu pour des fréquences faibles pendant la culture bactérienne.

La fréquence de 0,1 Hz (plus faible valeur utilisée dans nos expériences) a donc été choisie pour étudier les variations d'impédance et de phase de toutes les électrodes.

2.2.2.3. Etude de l'impédance à 0,1 Hz

Les variations du module et de la phase de l'impédance, mesurées à 0,1 Hz, sont comparées entre une expérience positive (croissance de 5 cfu d'*E. coli* ATCC 25922) et une expérience négative (stérile) pour chaque matériau d'électrode testé (**Figure 4-14**).

Le module de l'impédance est normalisé (valeur de 0 k Ω à t_0) afin de pouvoir comparer les évolutions sur les mêmes échelles.



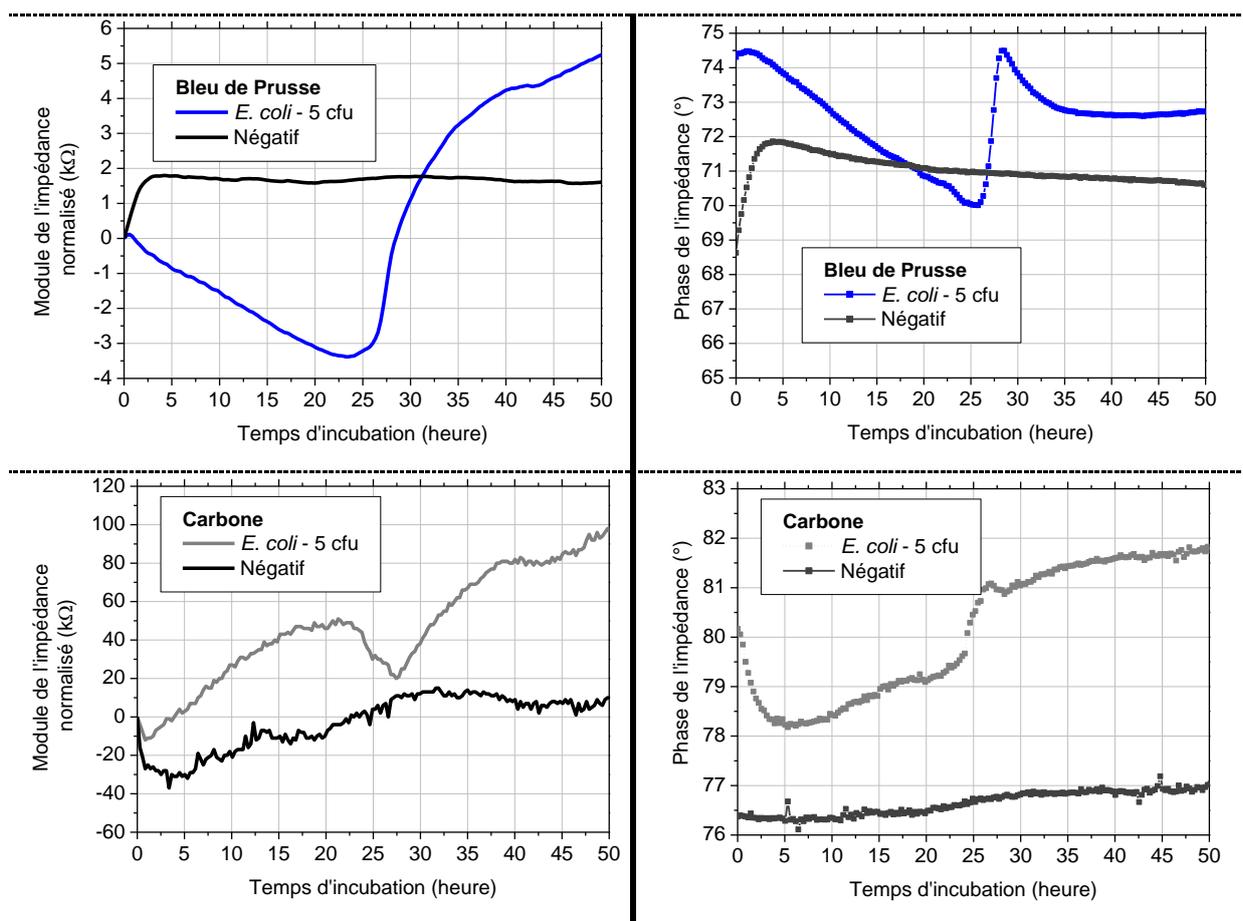


Figure 4-14 : Evolution du module normalisé (colonne de gauche) et de la phase (colonne de droite) de l'impédance obtenus à 0,1 Hz en fonction du temps, pour une croissance d'*E. coli* et pour un négatif, pour les 4 matériaux d'électrodes. Hémocultures de sang humain dans le Bact/ALERT® FA Plus, 20°C, 100 rpm.

De ces résultats, plusieurs observations et hypothèses peuvent être exprimées :

- i. Pour les encres polyaniline, oxyde d'iridium et carbone, le module de l'impédance chute pendant la croissance bactérienne, puis augmente ;
 - ⇒ Ceci semble indiquer la présence de molécules, au voisinage de l'électrode, favorisant le transfert de charges.
- ii. Le module de l'impédance de l'électrode en « encre bleu de Prusse » augmente avec la croissance bactérienne ;
 - ⇒ Ce matériau semble détecter uniquement le phénomène physique du recouvrement de l'électrode par les bactéries, ce qui n'est pas le cas des autres matériaux utilisés.

Conclure sur la cause des variations observées de la phase de l'impédance pour les différents matériaux n'a pas été possible au vu de la complexité du système étudié. Le caractère purement qualitatif de ces mesures limite la compréhension détaillée des processus biologiques et chimiques à

l'œuvre pendant la croissance bactérienne, des expériences plus poussées semblent nécessaires, notamment avec l'utilisation de sondes électrochimiques dans la solution de mesure.

Détection par mesure de l'impédance

Afin d'étudier la pertinence de cette mesure, plus complexe que la potentiométrie, pour détecter une croissance bactérienne, les courbes du module de l'impédance de la polyaniline ont été dérivées puis lissées sur 5 points pour l'expérience positive et l'expérience négative.

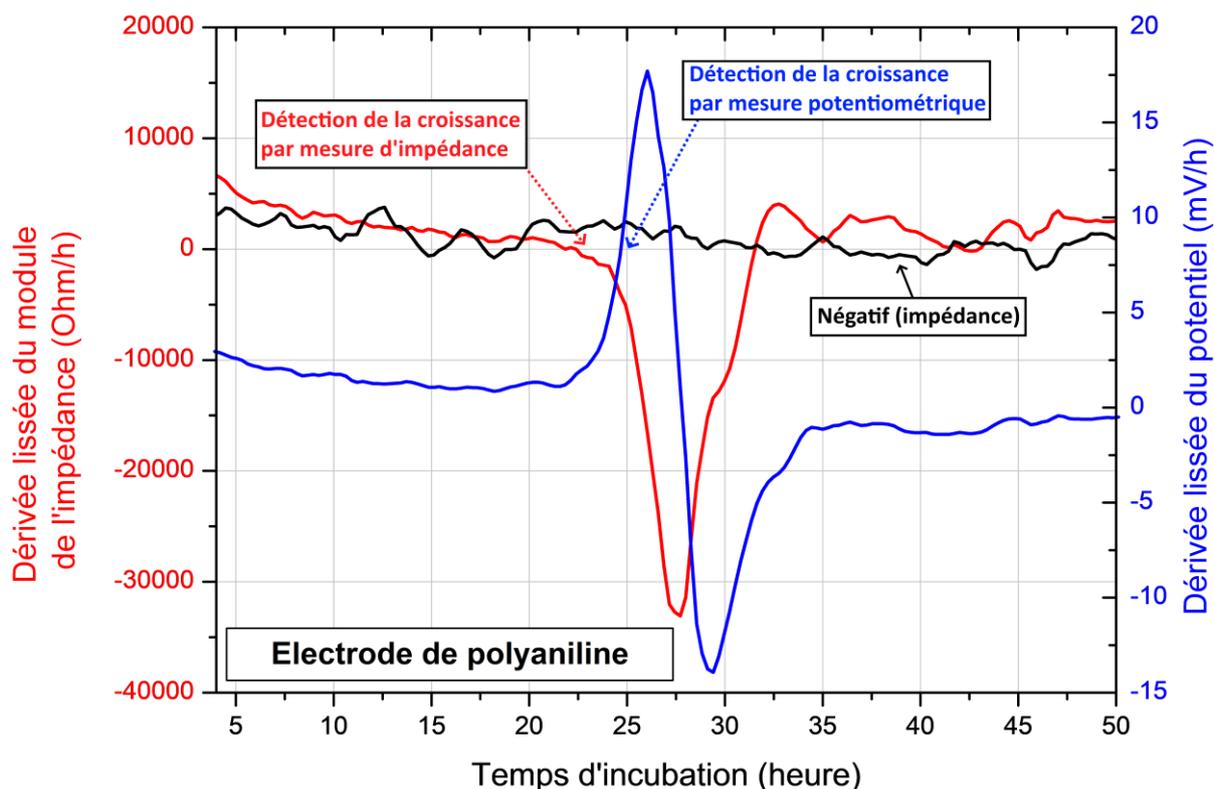


Figure 4-15 : Courbes de la dérivée lissée du module de l'impédance obtenues à 0,1 Hz et de la dérivée lissée du potentiel pour une croissance d'*E. coli*. Hémocultures de sang humain dans le Bact/ALERT® FA Plus, 20°C, 100 rpm.

Comme le montre la **Figure 4-15**, une mesure d'impédance à 0,1 Hz semble permettre de détecter une croissance bactérienne dans la même plage temporelle que la méthode de la dérivée lissée du potentiel expliquée en **Chapitre 3**. Compte tenu de la complexité de la mesure et de l'instrumentation, il ne semble pas pertinent d'utiliser l'EIS comme seule méthode de détection, cette méthode est cependant plus adaptée à la caractérisation des phénomènes électrochimiques mis en jeu et pourrait être complémentaire à la potentiométrie pour l'identification des bactéries.

2.3. Observations par microscopie numérique

Des observations ont été effectuées au microscope numérique dans l'objectif d'étudier la présence d'un biofilm bactérien à la surface des électrodes.

Une plateforme électrochimique classique a été immergée dans une solution de BacT/ALERT® FA Plus préalablement inoculée avec plusieurs centaines de cfu d'*Escherichia coli* (ATCC 25922).

Après 24 h d'incubation à 37°C, la plateforme a été retirée du milieu de culture puis immergée pendant 5 secondes dans de l'eau déionisée afin d'éliminer le plus possible les bactéries à sa surface. Aucune abrasion mécanique ou traitement chimique n'a été appliqué.

Cette plateforme a ensuite été observée au microscope numérique 4K (Keyence VHX-7000), permettant d'obtenir des images à très hautes résolutions (**Figure 4-16**).

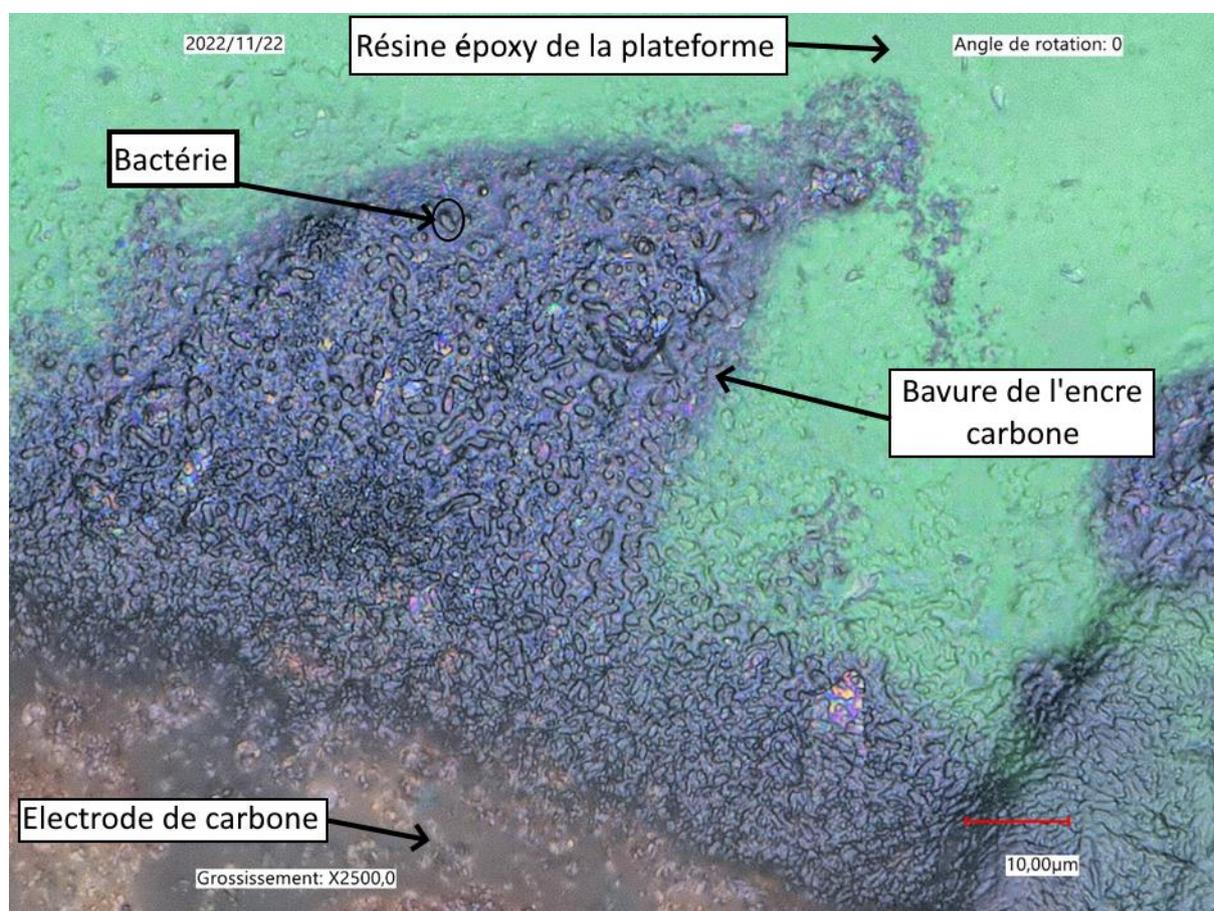


Figure 4-16 : Photo d'une plateforme électrochimique après croissance d'*E. coli* puis rinçage à l'eau déionisée. Grossissement X2500, microscope Keyence VHX-7000.

Compte tenu de l'épaisseur importante et de la couleur sombre de l'encre, la microscopie en réflexion n'a pas permis d'obtenir des images exploitables de « l'intérieur » d'une électrode (zone marron en bas sur la **Figure 4-16**). En revanche, grâce au dépôt manuel des encres, des bavures sont présentes tout autour de chaque électrode de travail. Dans cette zone l'encre est beaucoup moins épaisse et il

est possible d'effectuer des observations intéressantes. L'intérêt de cette image est la présence visuelle de cellules bactériennes sur l'encre carbone mais l'absence de ces bactéries sur la résine époxy de la plateforme (en vert).

Ceci semble indiquer que le rinçage effectué a été efficace, sinon des bactéries seraient présentes sur l'ensemble de la plateforme. De plus, les bactéries *E. coli* semblent avoir une affinité plus importante pour l'encre carbone que pour la résine époxy de la plateforme. L'affinité d'une bactérie pour une surface dépend de nombreux paramètres tels que sa mouillabilité ou rugosité, il est donc difficile de généraliser l'observation de la **Figure 4-16** à toutes les bactéries et aux 4 matériaux d'électrodes utilisés.

Couplée aux résultats précédemment discutés (avec filtration passive et mesure EIS), cette observation par microscopie tend cependant à renforcer les éléments indiquant la présence d'un biofilm bactérien à la surface de nos électrodes.

Dans de futures études, il serait intéressant d'étudier une éventuelle corrélation entre « temps de positivité » et « affinité avec les bactéries » de chaque matériau d'électrode, avec pour hypothèse :

Une électrode ayant une grande affinité avec les bactéries sera plus rapidement colonisée donc la croissance bactérienne à sa surface sera plus précoce donc la détection sera plus rapide avec ce matériau.

On imagine alors une utilisation de matériaux ou procédés calibrés pour favoriser l'adhésion bactérienne ou, au contraire, anti-*biofouling* pour évaluer l'impact de la colonisation bactérienne des électrodes sur le temps de détection.

3. Conclusion

Les expériences présentées dans ce chapitre ont permis de développer notre compréhension des phénomènes chimiques et biologiques responsables des variations de potentiel utilisées dans le **Chapitre 3** pour détecter et identifier un micro-organisme pendant sa croissance. En effet, ces phénomènes :

- a. sont présents et visibles pour différents milieux de culture ;
- b. peuvent être décalés dans le temps par abaissement de la température d'incubation ;
- c. sont légèrement modifiés en l'absence d'agitation ;
- d. ne sont pas modifiés en augmentant significativement la surface des électrodes de travail ;

- e. ne sont pas présents lors d'une mesure dans le milieu de culture filtré, donc en l'absence de bactérie ;
- f. ne sont pas perturbés par des mesures d'impédance au potentiel d'abandon des électrodes ;
- g. se produisent simultanément à une chute ohmique pour les électrodes de polyaniline, d'oxyde d'iridium et de carbone ;
- h. sont observés simultanément à une augmentation du module de l'impédance de l'électrode en « encre bleu de Prusse ».

Toutes ces observations semblent indiquer que la méthode de détection et d'identification bactérienne, par mesure potentiométrique, développée pendant mon doctorat est étroitement liée à l'apparition d'un biofilm bactérien à la surface des électrodes. Ce biofilm générerait alors des molécules électroactives, probablement différentes pour chaque espèce (ce qui explique la possibilité d'identifier), qui provoqueraient un changement d'équilibre électrochimique, différent pour chaque matériau d'électrode.

Cette hypothèse nécessite toutefois d'autres expériences pour être confirmée, parmi lesquelles on peut citer :

- La reproductibilité des mesures d'impédance (avec des fréquences plus faibles si possible) ;
- L'utilisation d'une sonde redox pour une étude d'impédance permettant de caractériser les transports de matières en jeu ;
- Des études électrochimiques dynamiques (voltampérométrie cyclique par exemple), notamment sur les électrodes en carbone, pour observer des pics d'oxydation et/ou de réduction caractéristiques de certaines espèces chimiques connues ;
- Des observations des électrodes par microscope électronique à balayage après croissance bactérienne (et rinçage) ;
- Des observations des électrodes par microscope confocale en fluorescence après croissance bactérienne d'une souche marquée (et rinçage) ;
- L'utilisation de souches bactériennes mutantes incapables de former un biofilm afin d'observer la modification de la signature électrochimique en l'absence de colonisation de l'électrode.

Si le dispositif développé est effectivement un capteur de biofilm, cette technologie peut être utile dans plusieurs autres domaines que l'hémoculture. Ces perspectives seront discutées dans la conclusion de ce manuscrit.

Conclusion générale et perspectives

La détection électrochimique des infections sanguines

Après une phase de recherches bibliographiques pour cerner le sujet et ses enjeux (**Chapitre 1**), la création d'un flacon d'hémoculture instrumenté par une plateforme électrochimique a été le premier jalon à avoir été franchi (**Chapitre 2**). Une fois ce prototype fiabilisé, le travail de recherche a pu être découpé en deux grandes parties.

Le **Chapitre 3** a été consacré à l'étude des évolutions de potentiel de différents matériaux d'électrodes, dans un milieu biologique complexe tel que le sang total, en l'absence et en présence de micro-organismes. Les résultats expérimentaux obtenus ont été utilisés pour évaluer les possibilités d'enchaîner, dans le flacon instrumenté, un test d'identification consécutivement à la détection.

Les causes de ces évolutions potentiométriques ont par la suite été étudiées dans le **Chapitre 4** où l'hypothèse de la croissance d'un biofilm à la surface des électrodes a été discutée.

La détection d'une croissance bactérienne par une mesure potentiométrique a été mise en évidence pour 4 matériaux d'électrodes : la polyaniline, l'oxyde d'iridium, une encre carbone contenant du bleu de Prusse et une encre carbone commerciale.

Les évolutions de potentiel associées à cette détection ont pu être reliées à deux grandeurs : la concentration bactérienne dans la solution mesurée et, de façon plus contrastée, le pH de cette solution. Contrairement à l'objectif initial, qui était la réalisation d'un capteur de pH, les matériaux étudiés ont réagi à d'autres espèces chimiques présentes uniquement en cas de croissance bactérienne.

L'utilisation d'un traitement de données simple (une dérivée lissée sur 5 points glissants) a permis de calculer des temps de détection et de découvrir des profils électrochimiques particuliers. La forme de ces empreintes électrochimiques semble indépendante de la quantité de bactéries inoculées et varie plus fortement entre deux espèces qu'entre deux souches différentes.

Les temps de détection obtenus via notre méthode étant cohérents avec ceux calculés pour des automates d'hémocultures commerciaux, nous avons décidé de dépasser cette phase pour nous concentrer sur une identification sans manipulation, à l'aide des signatures électrochimiques de chaque espèce.

A partir d'une base de données de 60 expériences (14 espèces, 9 genres différents), un algorithme d'apprentissage artificiel a été développé en interne. Nous avons montré qu'une classification

correcte, au Gram et au genre bactérien, était réalisable quelques heures seulement après la positivité du flacon d'hémoculture, **sans requérir la manipulation du sang infecté par une intervention humaine ni ajout de réactif**. Les performances calculées, **99 % pour la détermination du type de Gram (5 h 45 après positivité) et 85 % pour celle du genre (7 h 45 après positivité)**, sont particulièrement intéressantes au regard de la base de données réalisée. Des perspectives d'amélioration sont déjà envisagées avec des algorithmes croisés.

La reproductibilité des signatures électrochimiques observées, alors même que chaque expérience correspondait à un patient différent, nous a conduit à étudier les mécanismes biologiques et chimiques responsables de ces évolutions de potentiel.

Les expériences ont montré que les signatures semblent indépendantes du milieu de culture, mais également de la température et de l'agitation.

L'absence de signature observée sur une solution de métabolites, stérilisée par microfiltration, nous a conduit à envisager la formation d'un biofilm à la surface des électrodes comme étape nécessaire à l'enregistrement de ladite signature.

Des mesures d'impédance réalisées dans les dernières semaines de la thèse révèlent une chute ohmique pour certains matériaux d'électrodes pendant la croissance bactérienne. Cette observation tend à confirmer notre hypothèse : ce biofilm sécrète très probablement des molécules électroactives au voisinage des électrodes, ces molécules seraient alors responsables des évolutions de potentiel permettant la détection et l'identification.

La pertinence de la mesure potentiométrique, à l'aide d'un réseau de capteurs multi-matériaux, pour la détection de la croissance bactérienne a été démontrée. De plus, une méthode d'identification à travers l'analyse, par apprentissage machine, des profils des signaux mesurés, a été développée.

Ce doctorat a donc permis le **développement de capteurs électrochimiques pour le diagnostic des infections sanguines**. Cependant, de nombreuses questions demeurent concernant les phénomènes biologiques et chimiques à l'œuvre lors du processus de détection (et d'identification). L'hypothèse d'une croissance d'un biofilm à la surface même des électrodes semble la plus probable, mais sa validation nécessiterait une étude plus approfondie.

Enfin, des tests complémentaires pour analyser les réponses d'autres matériaux d'électrodes seraient très intéressants. Il est probable en effet que certains matériaux puissent présenter des caractéristiques plus avantageuses que ceux utilisés dans cette thèse (*e.g.* capacité à favoriser la formation de biofilms, sensibilité accrue, meilleure discrimination des signatures inter-espèces, rapport performance/prix plus intéressant).

Une utilisation future de cette technologie dans le diagnostic des bactériémies semble donc pertinente, peut-être plus spécifiquement dans des contextes où les temps de transport sont longs (déserts médicaux, milieux isolés, pays à faibles revenus...). En effet, les mesures potentiométriques peuvent être intégrées à un dispositif d'incubation portatif, autorisant alors l'utilisation du trajet comme temps d'incubation (**Figure C-1**).

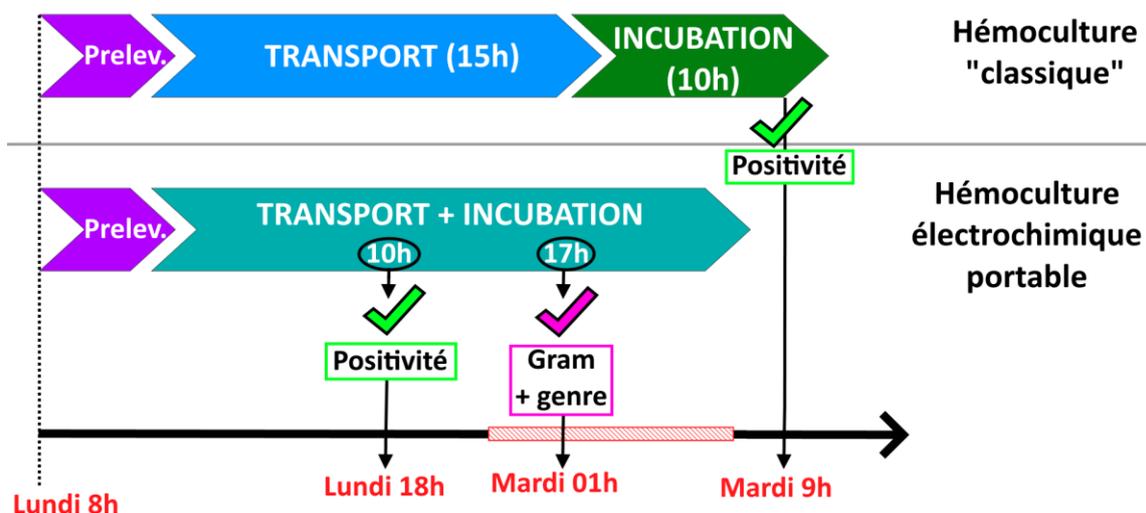


Figure C-1 : Schéma d'analyse simplifiée d'une hémoculture effectuée par les méthodes classiques et par notre méthode (temps de transport long = 15 h¹ / temps d'incubation = 10 h).

L'objectif de l'application ayant été très présente pendant ce doctorat, le **Tableau C-1** répertorie les caractéristiques envisageables du flacon d'hémoculture instrumenté, permettant ainsi une comparaison avec les autres méthodes utilisées dans le domaine de l'hémoculture (voir **Tableau 1-1** du **Chapitre 1**).

Le coût d'un flacon instrumenté commercial a été estimé sommairement, en supposant des améliorations significatives concernant le dispositif en lui-même (encres et/ou connectiques moins chères) ainsi que la mesure (utilisation d'un potentiomètre).

Tableau C-1 : Caractéristiques envisageables du dispositif développé pendant ce doctorat.

Rapidité du test	Détection	Aussi rapide que les meilleurs automates mais portable
	Identification	7 h supplémentaires, en automatique
Encombrement	Poids	Un flacon (< 100 g)
	Volume	Un incubateur (1 à 2 L si portable)
Temps technicien (par test)		0 minute
Coût approximatif	Par test	1 – 10 € (prix d'une plateforme électrochimique)
	De l'équipement	500 – 2000 € (prix d'un potentiomètre)

Impact environnemental

Comme toute nouvelle technologie, l'impact environnemental du flacon d'hémoculture instrumenté (électrochimiquement) est un calcul qui mériterait d'être effectué. Actuellement, compte tenu de la complexité et du manque de recul sur un possible industrialisation, il n'a pas été possible de proposer une conclusion sur cet axe.

Cependant quelques pistes concernant l'impact généré par cette thèse, les avantages et les inconvénients de cette technologie (à travers le prisme environnemental) et les améliorations envisageables, sont présentes en **Annexe IV**.

Perspectives

Grâce aux résultats exposés dans ce manuscrit, nous avons imaginé plusieurs perspectives concernant la poursuite de ce sujet d'étude. Elles concernent trois grands thèmes :

1. La poursuite des travaux détaillés dans le **Chapitre 4** ;
2. Le développement de la technologie d'hémoculture par électrochimie ;
3. L'application de la technologie développée à d'autres domaines.

Projet de recherche

Plusieurs expériences sont nécessaires pour comprendre les mécanismes chimiques et biologiques mis en jeu lors de la détection et l'identification (**Figure C-3**). Il serait alors pertinent de débiter par développer un banc de mesure adapté à la mesure d'impédance d'une culture bactérienne (température et agitation contrôlées). Puis les expériences du **Chapitre 4** seraient reproduites pour quelques micro-organismes pertinents, en milieu simple (TSB) ou complexe (sang), en augmentant la plage de fréquences balayées.

Pour étudier particulièrement les métabolites responsables des variations d'impédance enregistrées, des mesures électrochimiques dynamiques (voltampérométrie cyclique ou voltampérométrie à signaux carrés par exemple) pourraient ensuite être réalisées à différentes étapes de la croissance et éventuellement dans des milieux microfiltrés pour en retirer toutes les cellules.

L'étude des métabolites produits au niveau de la couche basale du biofilm, c'est-à-dire au voisinage immédiat de l'électrode, est complexe car cette zone est difficile d'accès. Il pourrait donc être intéressant d'utiliser des cartes microfluidiques afin de piéger une bactérie dans un puits (**Figure C-2**). La croissance en biofilm sur ce puits permettrait peut-être d'avoir accès aux molécules sécrétées par

cette couche basale. Cette technologie a déjà été développée au CEA/LETI pour l'étude des organoïdes, notamment par Clément Quintard¹.

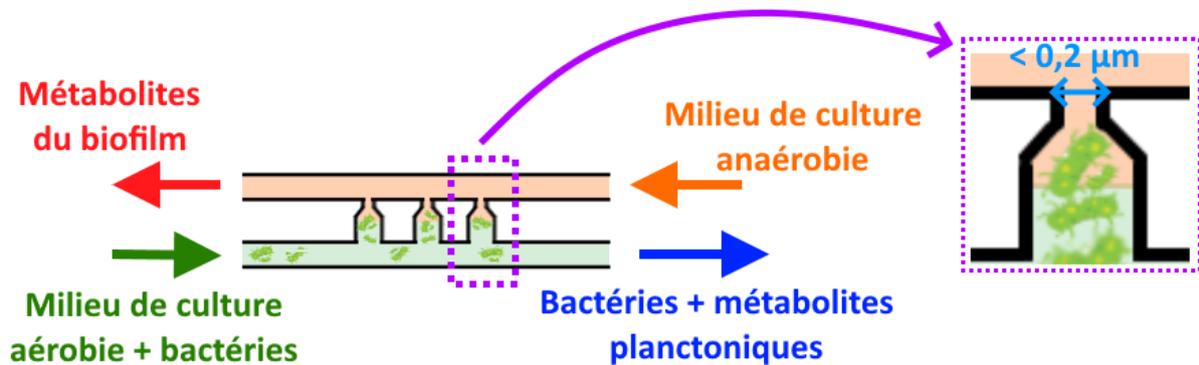


Figure C-2 : Schéma du principe microfluidique imaginé pour isoler les métabolites bactériens produits par la couche basale du biofilm.

Une analyse électrochimique du biofilm pourrait s'effectuer grâce à une sonde redox ajoutée au milieu de culture. Des mesures d'impédance pourraient ainsi nous renseigner sur la dynamique du transfert de matière et donc de la création du biofilm sur les électrodes, en fonction du matériau choisi. Couplés à des observations par microscopie (MEB ou confocale en fluorescence si utilisation de souches marquées), ces résultats nous en apprendraient un peu plus sur l'affinité de chaque matériau pour différents micro-organismes.

En outre, le suivi potentiométrique de cultures de souches génétiquement modifiées pour inhiber certaines voies métaboliques permettrait éventuellement de mettre en évidence la participation de métabolites précis à l'élaboration de la signature potentiométrique globale.

Enfin, les quelques expériences menées avec des matériaux d'électrodes différents des quatre principalement utilisés lors de mon doctorat (**Annexe V**) indiquent un intérêt à explorer cette voie pour améliorer les performances de l'identification bactérienne.

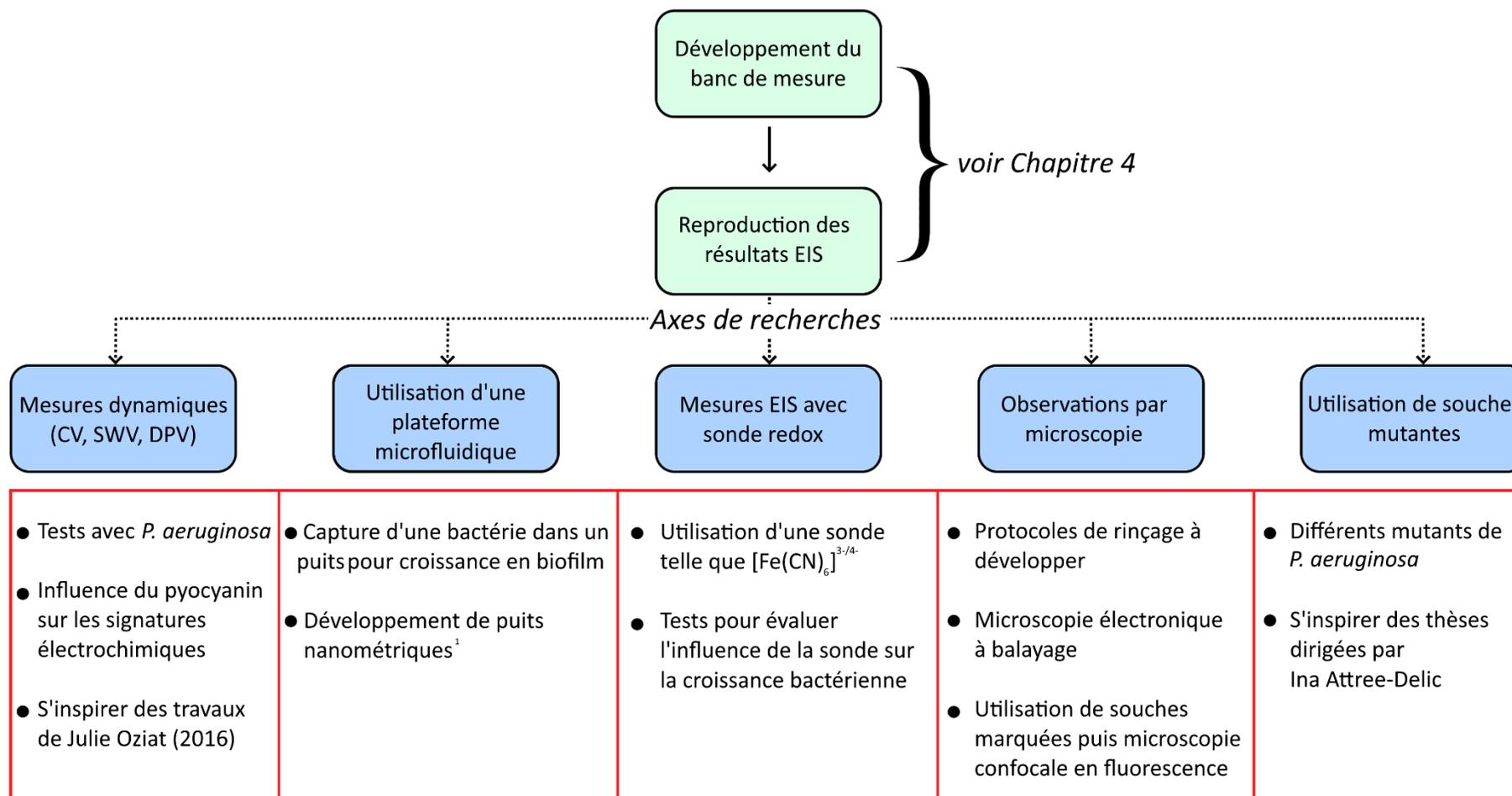


Figure C-3 : Perspectives pour la suite de ce doctorat avec différents axes envisagés.

Développement du procédé de mesure potentiométrique

Les résultats obtenus dans le **Chapitre 3** sont très intéressants et prometteurs concernant l'utilisation de la potentiométrie comme méthode de détection et d'identification bactérienne en hémoculture. Cependant des études complémentaires sont primordiales avant d'imaginer une industrialisation d'un prototype.

Tout d'abord, aucune expérience n'a été effectuée en présence d'antibiotiques, molécules souvent présentes dans le sang des patients car le traitement débute le plus tôt possible (avec des antibiotiques à spectre large). L'influence de plusieurs antibiotiques sur les signatures électrochimiques doit donc être étudiée en priorité pour déterminer dans quelle mesure la signature potentiométrique d'une espèce est modifiée.

Dans un second temps, si la présence d'antibiotiques ne dégrade pas ou peu les performances du dispositif, nous devons mener des études cliniques. La difficulté de ces études réside dans le taux de positivité des hémocultures à l'hôpital : à peine 10 %^{**}. On estime que la construction de la base de données permettant l'identification requiert un minimum de 100 expériences (flacons positifs) par espèce bactérienne^{††}. Même en ne ciblant que les 10 pathogènes les plus fréquemment rencontrés dans les hémocultures, le nombre minimum de flacons instrumentés nécessaires est alors de 10 000 (1000 positifs). La fabrication d'autant de dispositifs est un défi technique relevant de l'industrialisation à grande échelle, qu'il faudrait donc mettre en œuvre pour une étude clinique.

Une solution envisageable est l'utilisation de sangs prélevés sur patient puis inoculés (après confirmation de leur stérilité) avec des bactéries préalablement isolées à partir d'hémocultures positives et identifiées par MALDI-TOF. En procédant ainsi le nombre de dispositifs à fabriquer est exactement le nombre de flacons positifs requis à la base de donnée (donc 1000 dans ce cas). Comme étudié au **paragraphe 1.1 - Chapitre 4**, le sang humain vieilli pendant 5 jours d'incubation ne semble pas être une modification impactant significativement la signature potentiométrique observée pour *E. coli*, une étude complémentaire sur d'autres espèces permettrait de confirmer ce résultat.

Cette méthode permettrait alors de valider notre procédé de détection et d'identification sur sang de patients récemment prélevés, avec des souches cliniques (pas de référence). La base de données serait

^{**} Chiffre provenant de la présentation « *Bonnes pratiques de prélèvements – Les hémocultures* » aux 16^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie par Nejla AISSA et Eliette JEANMAIR.

^{††} Pour éviter l'écueil du sur-apprentissage, il est important de collecter un nombre de mesures, par classe d'apprentissage, qui soit largement supérieur au nombre de dimensions du descripteur, en l'occurrence 59.

beaucoup plus fournie que celle construite pendant cette thèse, les algorithmes de détection et d'identification pourraient être améliorés et les performances fiabilisées.

Applications industrielles envisagées

Comment instrumenter des flacons ?

L'utilisation de capteurs au sein d'un flacon d'hémoculture spécifiquement construit autour de cette problématique soulève plusieurs limites.

En effet, la création d'un flacon intégrant directement ce type de capteurs doit pouvoir être industrialisable à très grande échelle avec des normes de sécurité strictes. Le passage des connectiques à travers la paroi du flacon est un point de faiblesse structurelle important, pouvant occasionner fuites et casses (inévitable pour une bouteille contenant du sang contaminé). Le développement d'un prototype sera donc une étape cruciale, probablement complexe, occasionnant des coûts de fabrication difficilement supportables pour un consommable de laboratoire de microbiologie. De plus, un nouveau type de flacon d'hémoculture nécessitera la création d'usines dédiées et le changement d'habitude pour le personnel soignant. Enfin, en supposant l'existence d'un flacon embarquant des capteurs électrochimiques, des études approfondies seront nécessaires pour s'assurer que les différents matériaux d'électrodes ne relarguent pas de particules nocives dans les tubulures potentiellement au contact du patient (par l'intermédiaire de son sang veineux).

Rapidement, l'instrumentation des flacons d'hémoculture commerciaux a semblé être le choix le plus évident pour répondre à la majorité des problématiques exposées ci-dessus. Cependant, l'insertion des capteurs dans le flacon est un point critique car le perçage de la paroi est exclu pour des raisons évidentes de sécurité. En revanche, le bouchon du flacon d'hémoculture est une pièce exploitable.

La solution la plus évidente consiste à la fabrication de bouchons, instrumentés avec des capteurs. Cette technologie rajoute donc une étape dans le procédé d'hémoculture, après prélèvement un opérateur doit changer le bouchon du flacon. On peut noter 2 types de bouchons :

- Avec capteurs directement à l'intérieur, nécessitant alors un retournement du flacon afin de mettre en contact le liquide avec les électrodes ;
- Avec capteurs sur des appendices verticaux (tiges ou rubans), suffisamment longues pour être immergées dans la solution, entraînant une fabrication un peu plus complexe (**Figure C-4**).

Le fait de devoir déboucher un flacon contenant du sang humain pose plusieurs contraintes (travail sous environnement stérile pour éviter les faux positifs, besoin de personnel supplémentaire,

nécessité pour le bouchon d'assurer une fermeture parfaitement hermétique...). C'est pourquoi une autre méthode a été envisagée.

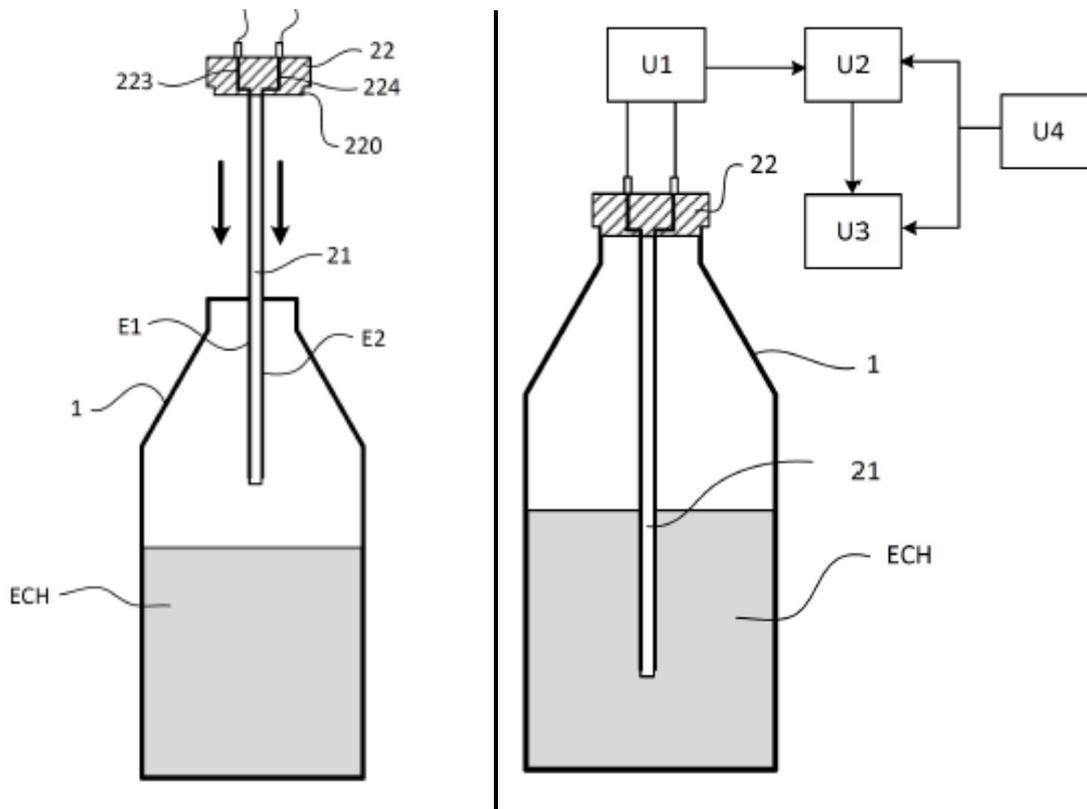


Figure C-4 : Schémas de principe d'un bouchon instrumenté avec une tige, où sont placées deux électrodes permettant la mesure. Figures 3A et 3B du brevet FR2208762^{}.**

Les flacons d'hémoculture commerciaux sont tous équipés d'un septum, un bouchon en polymère refermant le flacon tout en autorisant la pénétration d'une aiguille pour le prélèvement. Il y a donc une possibilité d'utiliser cette caractéristique du septum pour y insérer un objet où ont été déposés les matériaux d'électrodes désirés. Ce dispositif doit pouvoir être stérilisé tout en conservant une certaine solidité pour ne pas se briser lors de l'insertion dans le septum. Nous avons alors développé deux designs :

- Un clou instrumenté (une tige pleine, résistante) ;
- Une aiguille instrumentée (une tige creuse, plus fragile) permettant d'effectuer la prise de sang mais également de prélever l'échantillon après culture en évitant à l'opérateur d'utiliser une autre aiguille.

Pour chacun de ces dispositifs, des encres peuvent être déposées à leur surface, ou préférentiellement dans des tranchées prévues à cette effet (afin de protéger les encres lors du passage du septum),

^{**} T. Babin; P. Marcoux; P. Mailley; M. Gougis; M Rafie Jirdehi « Dispositif instrumenté employé pour la détection de présence de micro-organismes dans un échantillon liquide », déposé le 01/09/2022.

jusqu'à la partie externe (en dehors du flacon) qui permet la reprise de contact pour la mesure potentiométrique.

Ces inventions, dont les détails sont exposés en **Annexe VI**, ont fait l'objet d'un brevet déposé en septembre 2022.

Domaines d'applications de la détection électrochimique

Les résultats obtenus en début de **Chapitre 4** ont montré la possibilité d'utiliser la méthode développée dans différents milieux de culture. On peut donc imaginer aisément l'application des capteurs potentiométriques pour le contrôle de la stérilité :

- Des poches parentérales ;
- De n'importe quel solide (aiguilles, poudres, ustensiles chirurgicaux...) à condition de le plonger dans un milieu de culture liquide ;
- De la production (contrôle qualité) dans les domaines cosmétiques et pharmaceutiques.

Cette liste est non-exhaustive, l'ensemble des tests de stérilité étant potentiellement des marchés pertinents pour cette technologie. Cette ouverture est d'autant plus pertinente que les capteurs potentiométriques semblent fonctionner pour de nombreux micro-organismes différents (testés au cours du **Chapitre 3**). Bien que cette thèse se soit concentrée majoritairement sur des bactéries, quelques levures ont été utilisées. De plus, nous avons également envisagé l'utilisation de cette méthode pour la détection de mycobactéries, un genre bactérien particulier dont l'espèce la plus connue est *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose.

Ces micro-organismes doivent leur nom à la présence d'acides mycoliques (des longs acides gras) à leur surface². *Mycobacterium tuberculosis* est une bactérie à croissance lente qui nécessite des milieux de culture particuliers tels que le milieu Middlebrook 7H10, « composé d'un supplément d'acide oléique et d'albumine, de glycérol, de dextrose et de composés inorganiques »³.

Pour ce pathogène à croissance très lente et dans ce milieu de culture très différent de ceux testés jusqu'à présent, nous avons pu observer une détection de *Mycobacterium tuberculosis* en 11 jours à partir d'un inoculum de 53 cfu (**Annexe VII**).

Ce résultat indique que notre dispositif a un potentiel d'application bien plus large que l'hémoculture, par exemple dans la détection des mycobactéries.

Annexes

I. Hémoculture négative pendant 3 semaines

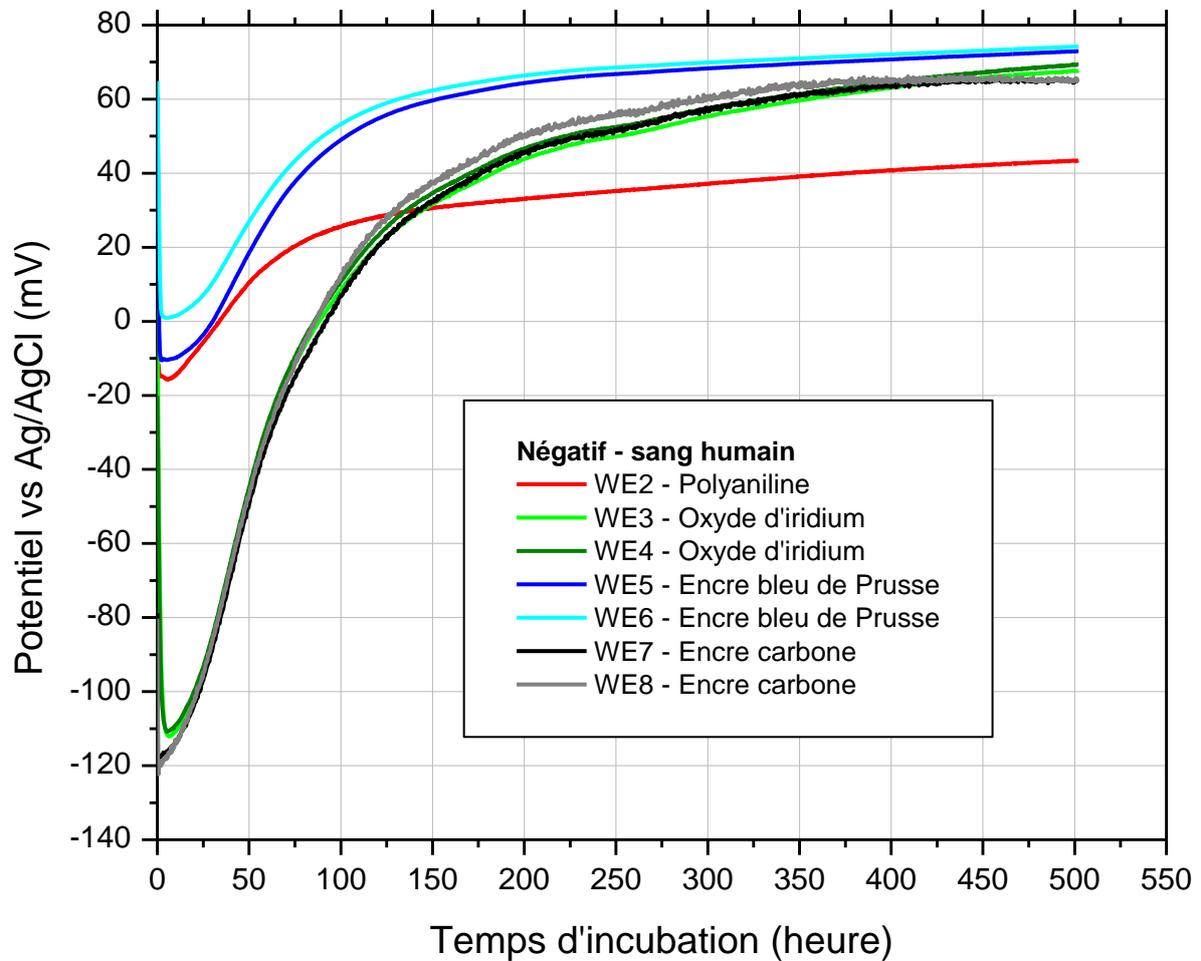


Figure A-1 : Courbes potentiométriques obtenues pour une expérience dite négative, pendant 3 semaines (504 heures). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT FA Plus, 37°C, 90 rpm. L'électrode de travail WE1 (Polyaniline) a eu un problème de connectique, elle a été enlevée du graphique.

II. Ensemble des signatures électrochimiques de la polyaniline pour *E. coli*

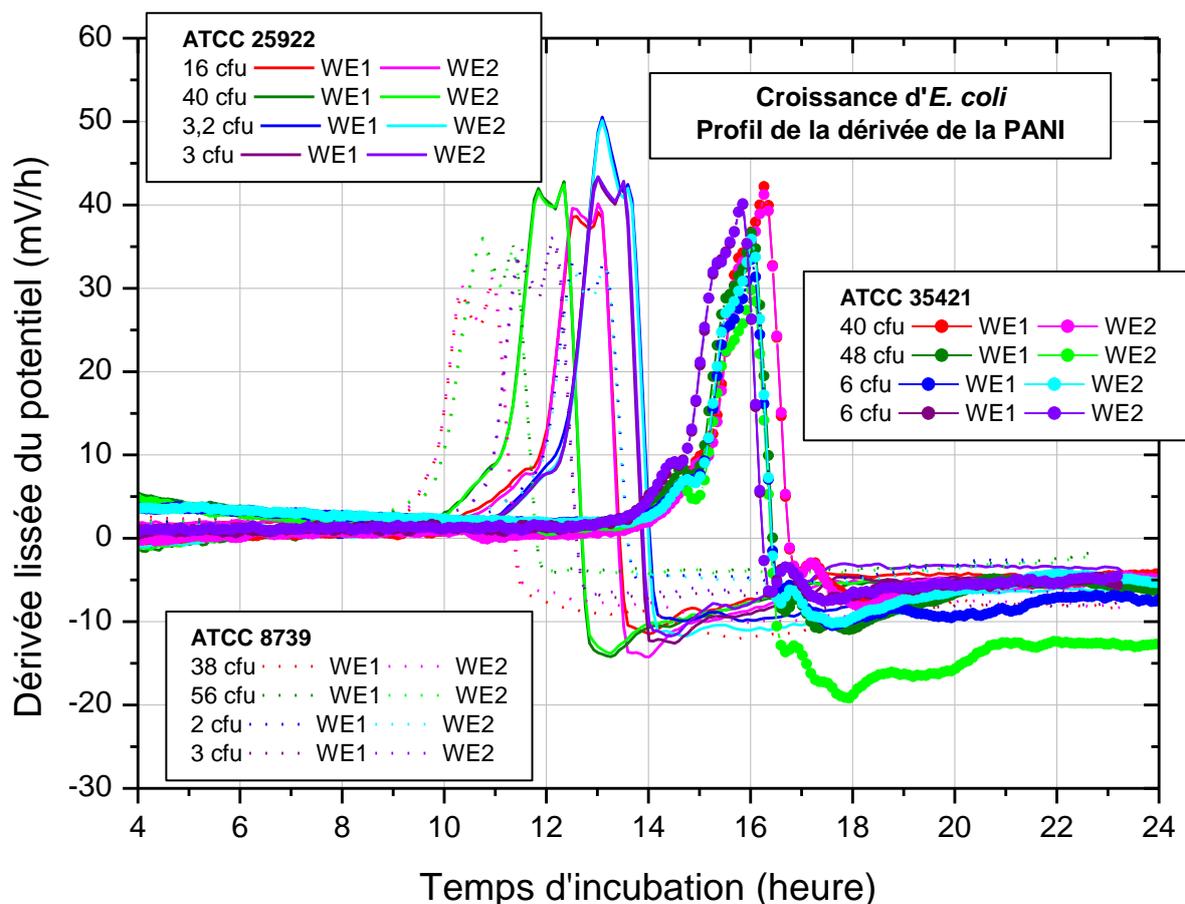


Figure A-2 : Courbes de dérivées lissées du potentiel avec la polyaniline pour 3 souches d'*E. coli*. L'ensemble des expériences est représenté, avec les inoculums et l'électrode de travail associés. Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT® FA Plus, 37°C, 90 rpm.

La Figure A-2 permet d'observer les variations de profils électrochimiques enregistrées pour différentes expériences, au sein d'une même espèce : *Escherichia coli*. Bien que ces variations existent entre deux hémocultures avec la même souche et soit même plus prononcées entre deux hémocultures avec des souches différentes, elles restent moins importantes que les variations inter-espèces comme montré dans le Chapitre 3.

En revanche, très peu de modifications sont observées entre deux électrodes d'un même dispositif, ce qui tend à confirmer la robustesse du procédé de fabrication établi dans le Chapitre 2.

III. Base de données utilisées pour l'identification par apprentissage machine

Tableau A-1 : Ensemble des expériences utilisées pour l'identification par apprentissage artificiel

Micro-organisme	Référence	Inoculum (cfu)	Donneur-euse		
			Sexe	Groupe	Rhésus
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	38	M	A	-
		56	M	O	-
		2,4	M	A	+
		3,3	M	O	+
	ATCC 35421	40	F	O	-
		48	F	A	-
		6	M	O	+
		5,6	M	O	-
	ATCC 25922	16	F	B	+
		40	M	A	-
		3,2	M	O	+
		3	M	A	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	ATCC 13048	96	F	A	+
		56	F	B	-
		4	M	A	+
		4	M	O	-
	ATCC 35029	8	M	O	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-1705	13	M	B	+
		24	F	O	+
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	3	M	O	+
		24	M	A	+
		3	M	A	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	72	M	O	+
		40	M	A	+
		2	F	O	+
		3	M	B	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	48	F	O	+
		72	M	O	+

		72	M	O	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13304	24	F	O	-
		24	M	O	+
	ATCC BAA-1605	36	F	AB	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	234	M	A	+
		288	M	A	+
		28	M	O	-
		23	M	O	+
	ATCC 35984	272	M	A	+
		152	M	A	+
		28	F	O	-
		15	M	A	+
	NCIMB 8853	224	M	B	+
		352	M	A	+
		21	F	A	+
		13	M	A	+
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	424	F	A
<i>Staphylococcus capitis</i>	ATCC 35661	127	F	O	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA-976	88	F	O	+
	ATCC 51153	280	M	O	-
	ATCC BAA-44	52	F	O	+
		32	F	O	+
	ATCC BAA-1708	40	M	A	+
	ATCC 33591	14	F	O	+
	NCIMB 12702	32	F	O	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	48	M	O	+
		88	M	O	+
	ATCC 51299	18	F	O	+
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057	40	F	A	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12384	56	F	A	-
	ATCC 12344	20	M	B	+
		42	M	O	+

IV. Impact environnemental et conception durable

Le secteur de la santé représente 8 % du total national des émissions de gaz à effet de serre en France⁵⁵. Bien que ce doctorat n'ait pas eu pour objectif initial de réduire l'empreinte carbone du diagnostic des bactériémies, le contexte mondial en terme de dérèglement climatique amène à une prise de conscience de la population et donc du milieu de la recherche. Il a semblé pertinent d'étudier (même succinctement) l'impact de mes recherches pendant ces 3 ans de doctorat, de critiquer certains choix et d'imaginer des pistes d'amélioration pour les projets futurs qui s'empareront de ce sujet.

Après un rapide calcul, j'ai estimé que les travaux réalisés pendant ma thèse ont engendré une consommation **minimum** de :

- 380 plateformes électrochimiques CIBEL
- 200 flacons BACT/ALERT® FA Plus
- 350 flacon Azlon™ en polypropylène
- 500 sacs autoclavables
- 1000 paires de gants en nitrile
- 1,5 L de sang humain
- 300 mL de sang de cheval défibriné
- 2500 tubes de diluant pharmaceutique
- 2000 boîtes de Petri

A cette quantité de matériel (jeté après utilisation) s'ajoute un fonctionnement **en continu** pendant **360 jours** d'un potentiostat Autolab PGSTAT128N, d'un incubateur Infors et d'un ordinateur fixe, uniquement pour la partie expérimentale.

Pistes de réflexion pour limiter cet impact

Certains choix ont été faits par facilité pendant cette thèse, une sensibilisation à la réduction de l'impact environnemental dès le début du doctorat aurait pu conduire à ces quelques points :

- ➔ Faire attention à la consommation des plateformes électrochimiques, ne produire qu'une fois le protocole expérimental fixé (pas en avance quitte à jeter) ;
- ➔ Ne pas débiter des expérimentations le vendredi soir pour éviter une mesure pendant 3 jours alors que 24 h suffisent ;
- ➔ Commencer plus tôt par une étude des différents milieux de culture, avec le recul les hémocultures auraient pu être effectuées dans du TSB en évitant de jeter 200 flacons BACT/ALERT vides ;
- ➔ Réfléchir à l'utilisation de verreries lavables afin de réutiliser des boîtes de Petri.

⁵⁵ The Shift Project. Décarboner La Santé Pour Soigner Durablement Dans Le Cadre Du Plan de Transformation de l'économie Française; Rapport final; 2021. <https://theshiftproject.org/wp-content/uploads/2021/11/211125-TSP-PTEF-Rapport-final-Sante.pdf> (accessed 2023-01-26).

L'acquisition des résultats aurait été certainement impactée par toutes ces mesures, un arbitrage aurait cependant pu être réalisé entre les bénéfices relatifs au développement d'une telle technologie vis-à-vis des coûts environnementaux engendrés.

Conception durable du flacon d'hémoculture instrumenté

Malgré le faible recul concernant l'industrialisation de ce dispositif, les résultats décrits dans ce manuscrit semblent indiquer qu'une mesure potentiométrique permet de détecter et d'identifier (au moins partiellement) un micro-organisme en culture dans un échantillon de sang. A travers le prisme de l'impact environnemental, le **Tableau A-2** répertorie quelques avantages et les limites (et solutions envisagées) de l'utilisation de ce dispositif.

Tableau A-2 : Quelques avantages, limites et éventuelles solutions, du flacon instrumenté vis-à-vis de son impact environnemental.

Avantages	Limites	
	Problèmes	Solutions envisagées
Pas de réactifs chimiques pour connaître le Gram	Incubateur portable à prévoir (nouveau dispositif inexistant actuellement)	Collaboration avec des entreprises ayant déjà du recul sur cette technologie (Q-linea)
Diagnostic plus rapide (temps de transport valorisé) donc moins d'antibiotiques administrés	Poids plus important à cause de l'instrumentation des flacons	Développer des capteurs sur substrats souples et légers type papier ^{***} .
Possible utilisation au chevet du patient donc pas de transport des flacons négatifs		

^{***} Jaiswal, A. K.; Kumar, V.; Jansson, E.; Huttunen, O.-H.; Yamamoto, A.; Vikman, M.; Khakalo, A.; Hiltunen, J.; Behfar, M. H. Biodegradable Cellulose Nanocomposite Substrate for Recyclable Flexible Printed Electronics. *Advanced Electronic Materials* **2023**, 2201094. <https://doi.org/10.1002/aelm.202201094>.

V. Signatures potentiométriques de quelques autres matériaux d'électrodes

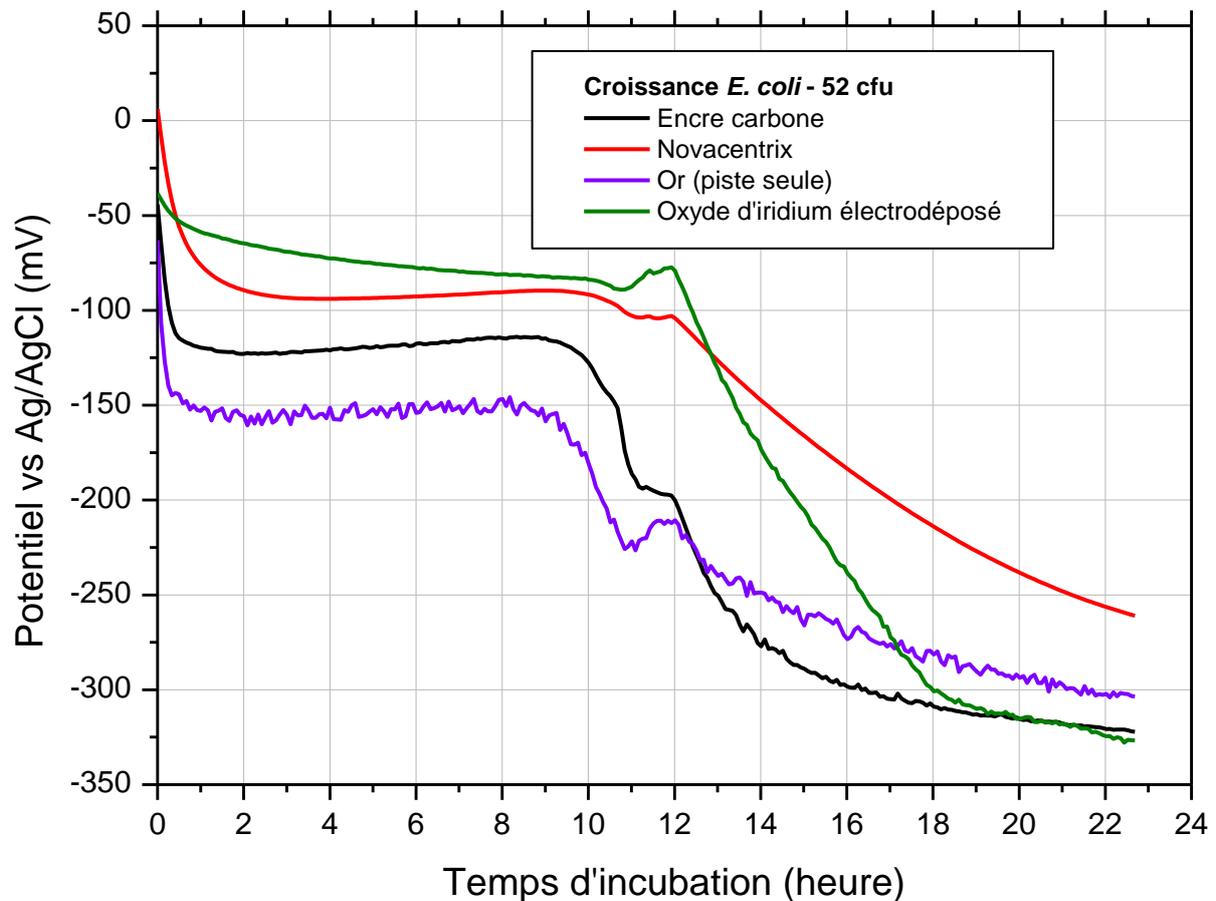


Figure A-3 : Courbes potentiométriques obtenues pour une croissance de 52 cfu d'*E. coli* (ATCC 8739). Hémocultures de sang humain dans le BacT/ALERT FA Plus, 37°C, 90 rpm.

Dans cette expérience, les électrodes de travail ne possèdent pas de sous-couche en encre carbone (BQ242 – DuPont). Les nouveaux matériaux utilisés sont :

- ➔ L'encre carbone NOVACENTRIX – JR-700HV ;
- ➔ La piste nue (sans encre) en or ;
- ➔ De l'oxyde d'iridium électro-déposé.

On remarque que chacun de ces matériaux possède une signature potentiométrique différente, éventuellement exploitable pour améliorer l'identification.

VI. Instrumentation des flacons d'hémoculture

Différentes solutions pour instrumenter un flacon d'hémoculture commercial avec des électrodes ont été envisagées. Deux méthodes ont fait l'objet d'un prototypage :

- i. Une aiguille comprenant des tranchées sur sa longueur extérieure. Les matériaux d'électrodes peuvent ainsi être déposés dans ces rigoles ce qui facilite la fabrication mais également protège l'électrode de l'abrasion mécanique induite par le passage de l'aiguille à travers le septum. (**Figure A-4 - a**).
- ii. Une plateforme électrochimique semblable à celle utilisée pendant ce doctorat mais d'une longueur suffisante pour assurer l'immersion des électrodes et d'une largeur moins importante pour envisager le passage du septum (**Figure A-4 - c**).

Seul le prototype d'aiguille instrumenté a été testé à ce jour dans un flacon d'hémoculture commercial (**Figure A-4 - b**).



Figure A-4 : (a.) Modèle 3D d'un design possible d'une aiguille présentant 2 tranchées, réalisé par Mehrsa Rafie Jirdehi. (b.) Utilisation de cette aiguille imprimée en 3D par SLA dans un flacon d'hémoculture avec sang humain. (c.) Design d'une plateforme électrochimique permettant d'instrumenter des flacons d'hémoculture BACT/ALERT®, réalisé par Charles Chatard.

Le prototype réalisé est une aiguille de 9 cm de long, 3 mm de diamètre, imprimée en 3D par SLA dans une résine dentaire autoclavable (RS-F2-SGAM-01 de Formlabs) ce qui a permis sa stérilisation sans impacter ses propriétés mécaniques.

Dans les tranchées ont été déposés plusieurs matériaux, différents suivant la fonction de la tranchée.

Concernant la tranchée « électrode de référence », elle est composée d'encre carbone (BQ242 – DuPont) afin de créer une piste électrique. De l'encre Ag/AgCl (5874 – Dupont) a été déposée à son embout, cette encre a été ensuite recouverte d'une membrane de polyuréthane à titre de membrane protectrice. Le reste de la piste a ensuite été recouverte d'encre diélectrique (5036 – DuPont) afin d'isoler le contact électrique autre que l'embout.

Concernant la tranchée « électrode de travail », elle est composée d'encre carbone (BQ242 – DuPont) et une encre polyaniline a été déposée à son embout, le reste de la piste est recouvert d'encre diélectrique (5036 – DuPont).

La reprise de contact a été ici faite avec de la colle argent sur une plateforme générique utilisée en laboratoire.

Fermeture de l'aiguille et reprise de contact

Nous avons proposé **Figure A-5** un design de bouchon remplissant deux fonctions :

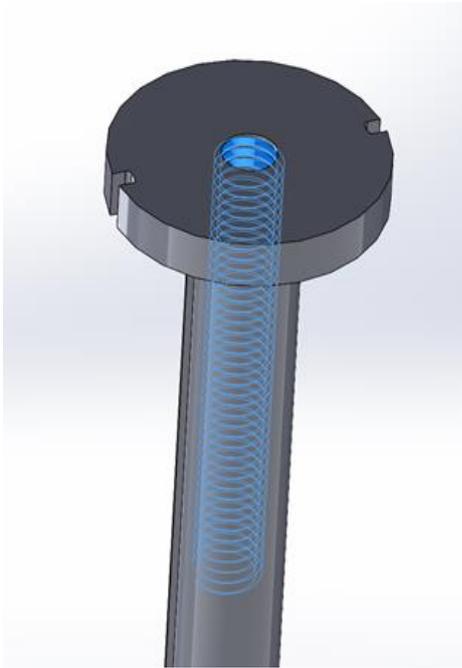
- La fermeture de l'aiguille afin d'éviter des contaminations du milieu mais également la fuite du contenu du flacon ;
- Une reprise de contact facilitée par la présence de deux pistes en métal sur le bouchon.

D'autres designs peuvent également être proposés, par exemple avec une fermeture type clip, permettant une étanchéité mais interdisant la réouverture. Le type de bouchon peut ainsi être adapté au test microbiologique réalisé.

L'utilisation d'une aiguille apporte **deux avantages pratiques** très intéressants, en plus des performances de la méthode électrochimique développée pendant ce doctorat (la détection et un début d'identification du pathogène présent sans manipulation ni réactif) :

- i. L'instrumentation de flacons d'hémoculture commerciaux permettrait d'éviter le changement de toute une gamme de consommable et des habitudes qui leur sont associées par le personnel soignant ;
- ii. A l'instar du flacon Signal™ commercialisé par Oxoid Ltd, cette aiguille permet un accès direct à l'hémoculture pour des futurs tests tels que l'antibiogramme.

a.



b.

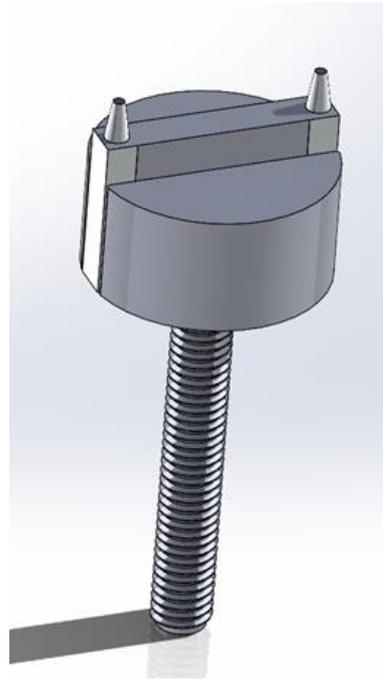


Figure A-5 : Modèle 3D d'un système permettant la fermeture et la reprise de contact d'une aiguille instrumentée, réalisé par Mehrsa Rafie Jirdehi. (a.) Utilisation d'un filetage interne dans l'aiguille. (b.) Bouchon avec reprise de contact en métal permettant la connectique de 2 fils.

VII. Détection d'une croissance de *Mycobacterium tuberculosis* par potentiométrie

Afin de pouvoir détecter cette espèce, deux flacons instrumentés ont été fabriqués (protocole en **Chapitre 2**) en remplaçant le milieu habituellement utilisé, BACT/ALERT® aérobie, par un milieu spécifique provenant des flacons BACTEC™ Myco/F Lytic, commercialisés par Becton Dickinson.

Un seul des deux flacons a été ensemencé avec 53 cfu de *M. tuberculosis* (ATCC 25177) selon le protocole publié par l'EUCAST en 2019⁺⁺⁺, permettant d'obtenir un 0,5 McF à partir d'une culture de mycobactéries (par l'utilisation de billes en verre pour disperser les colonies). Les comptages ont été effectués sur des tubes de milieu Lowenstein-Jensen (*BD 220909, ThermoFisher Scientific*).

La mesure de potentiel de deux électrodes de polyaniline s'est effectuée comme pour une hémoculture, à 37°C sous agitation (90 rpm), mais en enregistrant un point toutes les 1000 secondes (au lieu de 300 secondes/5 minutes pour une hémoculture) car les temps de détection pour ces tests sont habituellement beaucoup plus longs. Les courbes sont présentées en **Figure A-6**.

On remarque, comme pour le sang, une dérive progressive du potentiel de la polyaniline, même en l'absence de bactérie. Cependant, un changement de pente des courbes positives est nettement visible après 11 jours d'incubation (265 heures).

Cette inflexion des courbes peut être associée à la détection de la croissance de *M. tuberculosis* mais le temps de positivité mesuré ne peut pas être comparé à ceux obtenus avec des automates de dernières générations, pour deux raisons majeures :

- Cette expérience n'a pas été reproduite (temps de mobilisation du banc de mesure trop important) ;
- Le diagnostic de tuberculose se fait généralement à partir d'un échantillon de sécrétions respiratoires (non stérile, contrairement au sang). Des méthodes de décontamination sont donc nécessaires pour isoler la mycobactérie et ainsi éviter les faux-positifs⁴. Ces méthodes, qui peuvent stresser le micro-organisme (utilisation de soude ou d'acide), n'ont pas été appliquées dans notre expérience.

⁺⁺⁺ EUCAST. Reference Protocol for MIC Determination of Anti-Tuberculous Agents against Isolates of the Mycobacterium Tuberculosis Complex in Middlebrook 7H9 Broth - 2019. July 4, 2019. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Mycobacteria/Methods_in_AMST/Technical_protocol_A_MST_MIC_reference_method_190719.pdf.

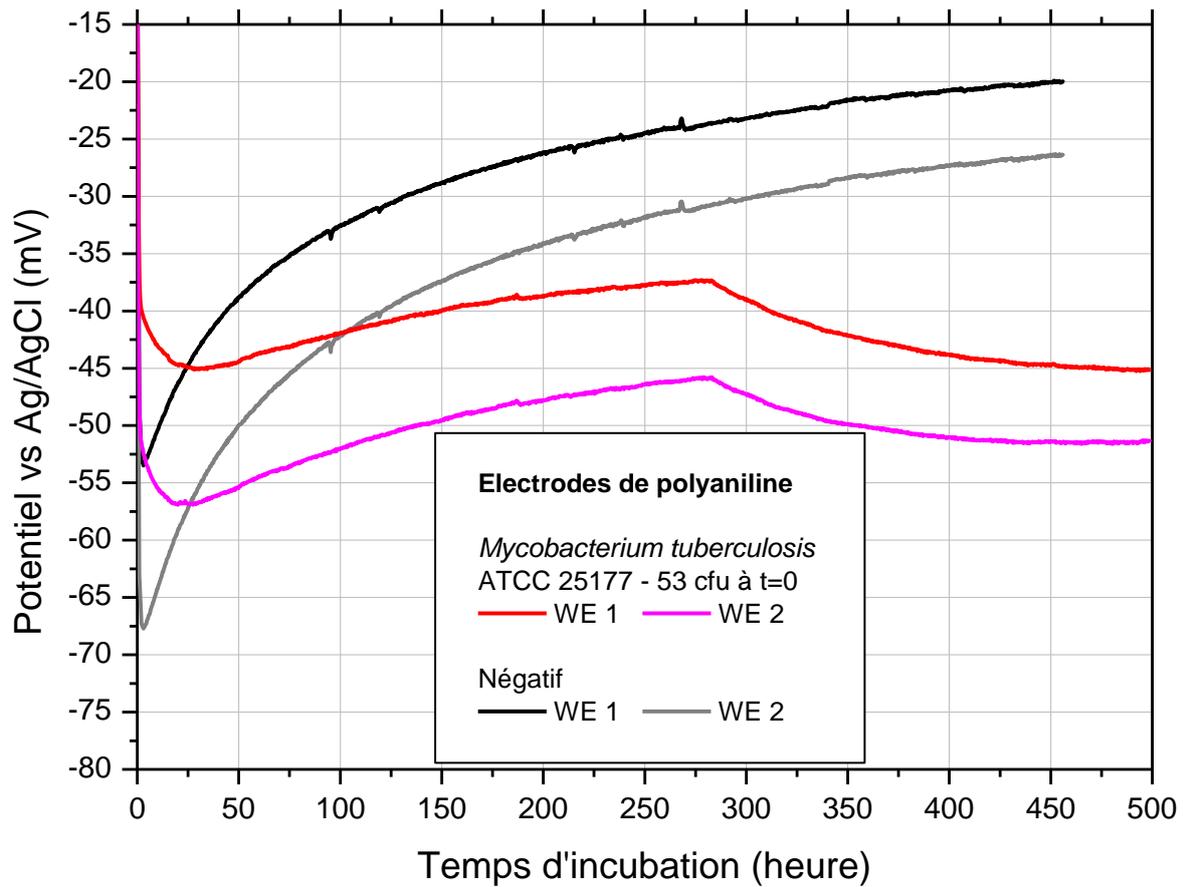


Figure A-6 : Potentiels en mV de deux électrodes de polyaniline, pour une culture de *Mycobacterium tuberculosis* et pour un négatif, dans 40 mL de milieu BACTEC™ Myco/F Lytic (Becton Dickinson), à 37°C et 90 rpm.

VIII. Production scientifique réalisée pendant ce doctorat

Articles scientifiques

Babin, T.; Dedole, T.; Bouvet, P.; Marcoux, P.; Gougis, M.; Mailley, P. Electrochemical label-free pathogen identification for bloodstream infections diagnosis: Towards a machine learning based smart blood culture bottle. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2023**, 387, 133748. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133748>.

Oziat, J.; Cohu, T.; Elsen, S.; Gougis, M.; Malliaras, G. G.; Mailley, P. Electrochemical Detection of Redox Molecules Secreted by *Pseudomonas Aeruginosa* – Part 1: Electrochemical Signatures of Different Strains. *Bioelectrochemistry* **2021**, 140, 107747. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107747>.

Oziat, J.; Babin, T.; Gougis, M.; Malliaras, G. G.; Mailley, P. Electrochemical detection of redox molecules secreted by *Pseudomonas aeruginosa* – Part 2: Enhanced detection owing to PEDOT:PSS electrode structuration. **2023**.

→ **En cours de corrections pour publication dans *Bioelectrochemistry***

Présentations orales lors de conférences nationales et internationales

- 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) - Avril **2022**, Lisbonne (Portugal)
- XXVIIth International symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics (BES) - Avril **2022**, Antwerp (Belgique)
- 17^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM) - Octobre **2022**, Montpellier (France)
- XVII^{ème} Conférence du Groupe Français de Bioélectrochimie (GFB) - Septembre **2022**, Saint Dié-des-Vosges (France)
- 5^{ème} Journée scientifique BactoGre - Février **2023**, Grenoble (France)

Brevets déposés

T. Cohu; M. Gougis; P. Marcoux; P. Mailley « Procédé et système pour détecter et éventuellement identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon. » **FR2114688**, déposée le 30/12/2021.

T. Babin; P. Marcoux; P. Mailley; M. Gougis; M Rafie Jirdehi « Dispositif instrumenté employé pour la détection de présence de micro-organismes dans un échantillon liquide. », **FR2208762**, déposé le 01/09/2022.

Bibliographie

Bibliographie de l'introduction

- 1) Goto, M.; Al-Hasan, M. N. Overall Burden of Bloodstream Infection and Nosocomial Bloodstream Infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19* (6), 501–509. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12195>.
- (2) Deku, J. G.; Dakorah, M. P.; Lokpo, S. Y.; Orish, V. N.; Ussher, F. A.; Kpene, G. E.; Angmorkie Eshun, V.; Agyei, E.; Attivor, W.; Osei-Yeboah, J. The Epidemiology of Bloodstream Infections and Antimicrobial Susceptibility Patterns: A Nine-Year Retrospective Study at St. Dominic Hospital, Akwatia, Ghana. *Journal of Tropical Medicine* **2019**, *2019*, 6750864. <https://doi.org/10.1155/2019/6750864>.
- (3) Biomérieux. Blood Culture: A Key Investigation for Diagnosis of Bloodstream Infections.
- (4) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C. *et al.* Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, *399* (10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- (5) Jim O'Neill. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. **2016**.

Bibliographie du Chapitre 1

- (1) Lamy, B. Automates Pour Hémostase en 2005. *BioTribune Magazine* **2005**, *16* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/BF03013617>.
- (2) Goto, M.; Al-Hasan, M. N. Overall Burden of Bloodstream Infection and Nosocomial Bloodstream Infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19* (6), 501–509. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12195>.
- (3) Deku, J. G.; Dakorah, M. P.; Lokpo, S. Y.; Orish, V. N.; Ussher, F. A.; Kpene, G. E.; Angmorkie Eshun, V.; Agyei, E.; Attivor, W.; Osei-Yeboah, J. The Epidemiology of Bloodstream Infections and Antimicrobial Susceptibility Patterns: A Nine-Year Retrospective Study at St. Dominic Hospital, Akwatia, Ghana. *Journal of Tropical Medicine* **2019**, *2019*, 6750864. <https://doi.org/10.1155/2019/6750864>.

- (4) World Health Organization. Key facts about sepsis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>.
- (5) Mitchell, K. F.; Yarbrough, M. L.; Burnham, C.-A. D. More than Just Contaminants: Frequency and Characterization of Polymicrobial Blood Cultures from a Central Clinical Microbiology Laboratory Serving a Large Healthcare System. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* **2021**, *6* (6), 1433–1440. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfab052>.
- (6) Lee, C.-C.; Lee, C.-H.; Hong, M.-Y.; Tang, H.-J.; Ko, W.-C. Timing of Appropriate Empirical Antimicrobial Administration and Outcome of Adults with Community-Onset Bacteremia. *Critical Care* **2017**, *21* (1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1696-z>.
- (7) Yamaga, S.; Shime, N. Association between Appropriate Empiric Antimicrobial Therapy and Mortality from Bloodstream Infections in the Intensive Care Unit. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2018**, *24* (4), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.11.011>.
- (8) Kumar, A.; Ellis, P.; Arabi, Y.; Roberts, D.; Light, B.; Parrillo, J. E.; Dodek, P.; Wood, G.; Kumar, A.; Simon, D.; Peters, C.; Ahsan, M.; Chateau, D. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock. *Chest* **2009**, *136* (5), 1237–1248. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0087>.
- (9) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C. *et al.* Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, *399* (10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- (10) Rhodes, A.; Evans, L. E.; Alhazzani, W.; Levy, M. M.; Antonelli, M.; Ferrer, R. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine* **2017**, *43* (3), 304–377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>.
- (11) World Health Organization. Key facts about antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- (12) Chiumento, S. Les Bactériocines RumC, Une Nouvelle Famille de Peptides Antimicrobiens Comme Alternative Aux Antibiotiques Conventionnels. Theses, *Université Grenoble Alpes*, **2019**. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02413219>.
- (13) Rasko, D. A.; Sperandio, V. Anti-Virulence Strategies to Combat Bacteria-Mediated Disease. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9* (2), 117–128. <https://doi.org/10.1038/nrd3013>.
- (14) Dufour, N.; Debarbieux, L. La Phagothérapie. *Med Sci (Paris)* **2017**, *33* (4), 410–416. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173304011>.
- (15) Kerremans J. J.; van der Bij A. K.; Goessens W.; Verbrugh H. A.; Vos M. C. Needle-to-Incubator Transport Time: Logistic Factors Influencing Transport Time for Blood Culture Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **2009**, *47* (3), 819–822. <https://doi.org/10.1128/JCM.01829-08>.

- (16) Biemer, J. J. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Annals of Clinical & Laboratory Science* **1973**, 3 (2), 135–140.
- (17) Tibbetts Robert; George Sheeja; Burwell Reece; Rajeev Lara; Rhodes Paul A.; Singh Pragya; Samuel Linoj. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **2022**, 60 (6), e00098-22. <https://doi.org/10.1128/jcm.00098-22>.
- (18) Ling Thomas K. W.; Tam P. C.; Liu Z. K.; Cheng Augustine F. B. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **2001**, 39 (8), 2964–2966. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2964-2966.2001>.
- (19) Weinbren, M. J.; Collins, M.; Heathcote, R.; Umar, M.; Nisar, M.; Ainger, C.; Masters, P. Optimization of the Blood Culture Pathway: A Template for Improved Sepsis Management and Diagnostic Antimicrobial Stewardship. *Journal of Hospital Infection* **2018**, 98 (3), 232–235. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.023>.
- (20) Lamy, B.; Sundqvist, M.; Idelevich, E. A. Bloodstream Infections – Standard and Progress in Pathogen Diagnostics. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, 26 (2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.017>.
- (21) Lamy, B.; Ferroni, A.; Henning, C.; Cattoen, C.; Laudat, P. How to: Accreditation of Blood Cultures' Proceedings. A Clinical Microbiology Approach for Adding Value to Patient Care. *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, 24 (9), 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.011>.
- (22) Hansen, G. T. Laboratory Blood Cultures: Past, Present, and Future. *Clinical Microbiology Newsletter* 2016, 38 (15), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2016.07.001>.
- (23) Pulvertaft, R. J. V. The Clinical Interpretation of Aids to Diagnosis: A Series of Special Articles Contributed by Invitation. *The Lancet* **1930**, 215 (5563), 821–822. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)88443-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)88443-3).
- (24) Rohner, P.; Auckenthaler, R. Review on Evaluations of Currently Available Blood-Culture Systems. *Clinical Microbiology and Infection* **1999**, 5 (9), 513–529. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00429.x>.
- (25) Sawhney, D.; Hinder, S.; Swaine, D.; Bridson, E. Y. Novel Method for Detecting Micro-Organisms in Blood Cultures. *J Clin Pathol* **1986**, 39 (11), 1259. <https://doi.org/10.1136/jcp.39.11.1259>.
- (26) Waters, J. R. Apparatus for Detecting Biological Activity. 3676679, 1972.
- (27) Levin Gilbert V.; Heim Allen H.; Clendenning John R.; Thompson Mary-Frances. “Gulliver”—A Quest for Life on Mars. *Science* **1962**, 138 (3537), 114–121. <https://doi.org/10.1126/science.138.3537.114>.

- (28) Rodrigues, C.; Shenai, S.; Almeida, D.; Sadani, M.; Goyal, N.; Vadher, C.; Mehta, A. USE OF BACTEC 460 TB SYSTEM IN THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS. *Indian Journal of Medical Microbiology* **2007**, *25* (1), 32–36. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02231-3](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02231-3).
- (29) Courcol R J; Fruchart A; Roussel-Delvallez M; Martin G R. Routine Evaluation of the Nonradiometric BACTEC NR 660 System. *Journal of Clinical Microbiology* **1986**, *24* (1), 26–29. <https://doi.org/10.1128/jcm.24.1.26-29.1986>.
- (30) Rimmer, K.; Cabot, M. Comparison of Bactec NR-660 and Signal Systems. *J Clin Pathol* **1988**, *41* (6), 676. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.6.676>.
- (31) Jungkind D; Millan J; Allen S; Dyke J; Hill E. Clinical Comparison of a New Automated Infrared Blood Culture System with the BACTEC 460 System. *Journal of Clinical Microbiology* **1986**, *23* (2), 262–266. <https://doi.org/10.1128/jcm.23.2.262-266.1986>.
- (32) van Elsacker-Niele, A. M. W.; Lichtendahl-Bernards, A. T.; Hermans, J.; Vandenbroucke, J. P.; Mouton, R. P. Comparison of the Automated Bactec NR-660 with a Conventional Blood Culture System. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **1989**, *8* (8), 724–726. <https://doi.org/10.1007/BF01963760>.
- (33) Levi M H; Gialanella P; Motyl M R; McKittrick J C. Rapid Detection of Positive Blood Cultures with the BACTEC NR-660 Does Not Require First-Day Subculturing. *Journal of Clinical Microbiology* **1988**, *26* (11), 2262–2265. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2262-2265.1988>.
- (34) Courcol R J; Duhamel M; Decoster A; Lemaire V M; Rastorgoueff M L; Ochin D; Martin G R. BioArgos: A Fully Automated Blood Culture System. *Journal of Clinical Microbiology* **1992**, *30* (8), 1995–1998. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.8.1995-1998.1992>.
- (35) SUSSMAN MARK L; AHNELL JOSEPH E; MCCARTHY LAURENCE R. Detection of the Presence of Biological Activity in a Sealed Container Utilizing Infrared Analysis of Carbon Dioxide and Apparatus Therefor. *US 5155019 A*, October 13, **1992**. <https://lens.org/066-009-096-608-358>.
- (36) Wolfbeis, O. S.; Weis, L. J.; Leiner, M. J. P.; Ziegler, W. E. Fiber-Optic Fluorosensor for Oxygen and Carbon Dioxide. *Anal. Chem.* **1988**, *60* (19), 2028–2030. <https://doi.org/10.1021/ac00170a009>.
- (37) Opitz, N.; Lübbers, D. W. Compact CO₂ Gas Analyzer with Favourable Signal-to-Noise Ratio and Resolution Using Special Fluorescence Sensors (Optodes) Illuminated by Blue Led's. In *Oxygen Transport to Tissue—VI*; Bruley, D., Bicher, H. I., Reneau, D., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1984**; pp 757–762. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4895-5_74.
- (38) Zaidi A K; Mirrett S; McDonald J C; Rubin E E; McDonald L C; Weinstein M P; Gupta M; Reller L B. Controlled Comparison of BioMérieux VITAL and BACTEC NR-660 Systems for Detection of Bacteremia and Fungemia in Pediatric Patients. *Journal of Clinical Microbiology* **1997**, *35* (8), 2007–2012. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.8.2007-2012.1997>.

- (39) Nolte F S; Williams J M; Jerris R C; Morello J A; Leitch C D; Matushek S; Schwabe L D; Dorigan F; Kocka F E. Multicenter Clinical Evaluation of a Continuous Monitoring Blood Culture System Using Fluorescent-Sensor Technology (BACTEC 9240). *Journal of Clinical Microbiology* **1993**, *31* (3), 552–557. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.3.552-557.1993>.
- (40) Murray Patrick R.; Hollick Gary E.; Jerris Robert C.; Wilson Michael L. Multicenter Comparison of BACTEC 9050 and BACTEC 9240 Blood Culture Systems. *Journal of Clinical Microbiology* **1998**, *36* (6), 1601–1603. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.6.1601-1603.1998>.
- (41) Thorpe T C; Wilson M L; Turner J E; DiGuseppi J L; Willert M; Mirrett S; Reller L B. BacT/Alert: An Automated Colorimetric Microbial Detection System. *Journal of Clinical Microbiology* **1990**, *28* (7), 1608–1612. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.7.1608-1612.1990>.
- (42) bioMérieux. BACT/ALERT® - Flacons. <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/bactalert-flacons> (accessed 2022-11-30).
- (43) Yue, P.; Zhou, M.; Kudinha, T.; Xie, X.; Du, J.; Song, H.; Zhang, L.; Ma, X.; Weng, L.; Chai, W.; Zhu, H.; Yang, Q.; Xu, Y.-C. Clinical Performance Evaluation of VersaTrek 528 Blood Culture System in a Chinese Tertiary Hospital. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02027>.
- (44) Jacobs Michael R.; Mazzulli Tony; Hazen Kevin C.; Good Caryn E.; Abdelhamed Ayman M.; Lo Pauline; Shum Bianche; Roman Katharine P.; Robinson Danielle C. Multicenter Clinical Evaluation of BacT/Alert Virtuo Blood Culture System. *Journal of Clinical Microbiology* **2017**, *55* (8), 2413–2421. <https://doi.org/10.1128/JCM.00307-17>.
- (45) Stewart, G. N. The Changes Produced by the Growth of Bacteria in the Molecular Concentration and Electrical Conductivity of Culture Media. *Journal of Experimental Medicine* **1899**, *4* (2), 235–243. <https://doi.org/10.1084/jem.4.2.235>.
- (46) Bancalari, E.; Bernini, V.; Bottari, B.; Neviani, E.; Gatti, M. Application of Impedance Microbiology for Evaluating Potential Acidifying Performances of Starter Lactic Acid Bacteria to Employ in Milk Transformation. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01628>.
- (47) PRIEGO, R.; MEDINA, L. M.; JORDANO, R. Bactometer System versus Traditional Methods for Monitoring Bacteria Populations in Salchichón during Its Ripening Process. *Journal of Food Protection* **2011**, *74* (1), 145–148. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-244>.
- (48) Piton, C.; Dasen, A.; Bardoux, I. Evaluation de La Mesure d'impédance Comme Technique Rapide d'appréciation de La Qualité Bactériologique Du Lait Cru. *Le Lait* **1988**, *68* (4), 467–484.
- (49) Walker, K.; Ripandelli, N.; Flint, S. Rapid Enumeration of Bifidobacterium Lactis in Milk Powders Using Impedance. *International Dairy Journal* **2005**, *15* (2), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.004>.

- (50) Brown, D. F.; Warner, M.; Taylor, C. E.; Warren, R. E. Automated Screening of Blood Cultures with the Malthus Microbiological Growth Analyser. *J Clin Pathol* **1988**, *41* (6), 671. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.6.671>.
- (51) Owens, J. D.; Thomas, D. S.; Thompson, P. S.; Timmerman, W. Indirect Conductimetry: A Novel Approach to the Conductimetric Enumeration of Microbial Populations. *Letters in Applied Microbiology* **1989**, *9* (6), 245–249. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00337.x>.
- (52) Bolton, F. J. An Investigation of Indirect Conductimetry for Detection of Some Food-Borne Bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **1990**, *69* (5), 655–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01559.x>.
- (53) Gould, I. M.; Jason, A. C.; Milne, K. Use of the Malthus Microbial Growth Analyser to Study the Post Antibiotic Effect of Antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1989**, *24* (4), 523–531. <https://doi.org/10.1093/jac/24.4.523>.
- (54) Brown, D. F.; Warner, M.; Taylor, C. E.; Warren, R. E. Automated Detection of Micro-Organisms in Blood Cultures by Means of the Malthus Microbiological Growth Analyser. *J Clin Pathol* **1984**, *37* (1), 65. <https://doi.org/10.1136/jcp.37.1.65>.
- (55) Dézenclos, T.; Ascon-Cabrera, M.; Ascon, D.; Lebeault, J.-M.; Paus, A. Optimisation of the Indirect Impedancemetry Technique; a Handy Technique for Microbial Growth Measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1994**, *42* (2), 232–238. <https://doi.org/10.1007/BF00902722>.
- (56) Janda J. Michael; Abbott Sharon L. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *Journal of Clinical Microbiology* **2002**, *40* (6), 1887–1891. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1887-1891.2002>.
- (57) Carbonnelle, E.; Mesquita, C.; Bille, E.; Day, N.; Dauphin, B.; Beretti, J.-L.; Ferroni, A.; Gutmann, L.; Nassif, X. MALDI-TOF Mass Spectrometry Tools for Bacterial Identification in Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Biochemistry* **2011**, *44* (1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>.
- (58) Lay Jr, J. O. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20* (4), 172–194. <https://doi.org/10.1002/mas.10003>.
- (59) Croxatto, A.; Prod'hom, G.; Greub, G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **2012**, *36* (2), 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.
- (60) Morgenthaler, N. G.; Kostrzewa, M. Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit.

- International Journal of Microbiology* **2015**, *2015*, 827416.
<https://doi.org/10.1155/2015/827416>.
- (61) Bunn; Atlas; Smith. *Microbiology Fundamentals - A Clinical Approach - Part 2*.
- (62) Wiesinger-Mayr, H.; Vierlinger, K.; Pichler, R.; Kriegner, A.; Hirschl, A. M.; Presterl, E.; Bodrossy, L.; Noehammer, C. Identification of Human Pathogens Isolated from Blood Using Microarray Hybridisation and Signal Pattern Recognition. *BMC Microbiology* **2007**, *7* (1), 78.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-78>.
- (63) Opota, O.; Croxatto, A.; Prod'hom, G.; Greub, G. Blood Culture-Based Diagnosis of Bacteraemia: State of the Art. *Clinical Microbiology and Infection* **2015**, *21* (4), 313–322.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003>.
- (64) Cortazzo Venere; D'Inzeo Tiziana; Giordano Liliana; Menchinelli Giulia; Liotti Flora Marzia; Fiori Barbara; De Maio Flavio; Luzzaro Francesco; Sanguinetti Maurizio; Posteraro Brunella; Spanu Teresa. Comparing BioFire FilmArray BCID2 and BCID Panels for Direct Detection of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance Genes from Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **2021**, *59* (4), e03163-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.03163-20>.
- (65) Willey; Sherwood; Woolverton. *Prescott - Microbiology*; Prescott.
- (66) Strachan, N. J. C.; Ogden, I. D. Detection of Microorganisms Using Gas Sensors. *WO 9404705*, **1994**.
- (67) Lim, S. H.; Mix, S.; Anikst, V.; Budvytiene, I.; Eiden, M.; Churi, Y.; Queralto, N.; Berliner, A.; Martino, R. A.; Rhodes, P. A.; Banaei, N. Bacterial Culture Detection and Identification in Blood Agar Plates with an Optoelectronic Nose. *Analyst* **2016**, *141* (3), 918–925.
<https://doi.org/10.1039/C5AN01990G>.
- (68) Lonsdale, C. L.; Taba, B.; Queralto, N.; Lukaszewski, R. A.; Martino, R. A.; Rhodes, P. A.; Lim, S. H. The Use of Colorimetric Sensor Arrays to Discriminate between Pathogenic Bacteria. *PLOS ONE* **2013**, *8* (5), e62726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062726>.
- (69) Carey, J. R.; Suslick, K. S.; Hulkower, K. I.; Imlay, J. A.; Imlay, K. R. C.; Ingison, C. K.; Ponder, J. B.; Sen, A.; Wittrig, A. E. Rapid Identification of Bacteria with a Disposable Colorimetric Sensing Array. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (19), 7571–7576. <https://doi.org/10.1021/ja201634d>.
- (70) Shrestha, N. K.; Lim, S. H.; Wilson, D. A.; SalasVargas, A. V.; Churi, Y. S.; Rhodes, P. A.; Mazzone, P. J.; Procop, G. W. The Combined Rapid Detection and Species-Level Identification of Yeasts in Simulated Blood Culture Using a Colorimetric Sensor Array. *PLOS ONE* **2017**, *12* (3), e0173130.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173130>.

- (71) Templier, V.; Livache, T.; Boisset, S.; Maurin, M.; Slimani, S.; Mathey, R.; Roupioz, Y. Biochips for Direct Detection and Identification of Bacteria in Blood Culture-Like Conditions. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 9457. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10072-z>.
- (72) Loonen, A. J. M.; Bos, M. P.; van Meerbergen, B.; Neerken, S.; Catsburg, A.; Dobbelaer, I.; Penterman, R.; Maertens, G.; van de Wiel, P.; Savelkoul, P.; van den Brule, A. J. C. Comparison of Pathogen DNA Isolation Methods from Large Volumes of Whole Blood to Improve Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections. *PLOS ONE* **2013**, *8* (8), e72349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072349>.
- (73) Neely Lori A.; Audeh Mark; Phung Nu Ai; Min Michael; Suchocki Adam; Plourde Daniella; Blanco Matthew; Demas Vasiliki; Skewis Lynell R.; Anagnostou Theodora; Coleman Jeffrey J.; Wellman Parris; Mylonakis Eleftherios; Lowery Thomas J. T2 Magnetic Resonance Enables Nanoparticle-Mediated Rapid Detection of Candidemia in Whole Blood. *Science Translational Medicine* **2013**, *5* (182), 182ra54-182ra54. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005377>.
- (74) Peker, N.; Couto, N.; Sinha, B.; Rossen, J. W. Diagnosis of Bloodstream Infections from Positive Blood Cultures and Directly from Blood Samples: Recent Developments in Molecular Approaches. *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, *24* (9), 944–955. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.007>.
- (75) Mylonakis, E.; Clancy, C. J.; Ostrosky-Zeichner, L.; Garey, K. W.; Alangaden, G. J.; Vazquez, J. A.; Groeger, J. S.; Judson, M. A.; Vinagre, Y.-M.; Heard, S. O.; Zervou, F. N.; Zacharioudakis, I. M.; Kontoyiannis, D. P.; Pappas, P. G. T2 Magnetic Resonance Assay for the Rapid Diagnosis of Candidemia in Whole Blood: A Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases* **2015**, *60* (6), 892–899. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu959>.
- (76) Giannella, M.; Pankey, G. A.; Pascale, R.; Miller, V. M.; Miller, L. E.; Seitz, T. Antimicrobial and Resource Utilization with T2 Magnetic Resonance for Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections: Systematic Review with Meta-Analysis of Controlled Studies. *Expert Review of Medical Devices* **2021**, *18* (5), 473–482. <https://doi.org/10.1080/17434440.2021.1919508>.
- (77) Oziat, J. Electrode 3D de PEDOT : PSS Pour La Détection de Métabolites Électrochimiquement Actifs de Pseudomonas Aeruginosa, **2016**.
- (78) Chmayssem, A.; Verplanck, N.; Tanase, C. E.; Costa, G.; Monsalve-Grijalba, K.; Amigues, S.; Alias, M.; Gougis, M.; Mourier, V.; Vignoud, S.; Ghaemmaghami, A. M.; Mailley, P. Development of a Multiparametric (Bio)Sensing Platform for Continuous Monitoring of Stress Metabolites. *Talanta* **2021**, *229*, 122275. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122275>.

- (79) labmedical Marketplace. Flacon d'hémoculture biphasique adulte (20+40mL). <https://www.labmedical.shop/Milieux-de-culture/3452-Flacon-d-h-moculture-biphasique-adulte.html>.
- (80) Thermo Fisher Scientific. Thermo Scientific™ Système d'hémoculture Signal™. <https://www.fishersci.fr/shop/products/thermo-scientific-oxid-signal-blood-culture-system/11933192>.
- (81) Buckland, A.; Kessock-Philip, S.; Bascomb, S. Early Detection of Bacterial Growth in Blood Culture by Impedance Monitoring with a Bactometer Model 32. *J Clin Pathol* **1983**, *36* (7), 823. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.7.823>.
- (82) BLOCK Scientific. Becton Dickinson BACTEC 9240 Blood Culture System. <https://www.blockscientific.com/becton-dickinson-bactec-9240-blood-culture-system#attr=>.
- (83) Sy-Lab. BacTrac 4300 - Multi-Sample Microbiological Monitoring System. https://www.cresca.upc.edu/eba2007/docs/pdf/C7.2.2Catalogo_bactrac4300_compress.pdf.
- (84) Merck. KAPA2G Fast Multiplex Mix - 2GFMPXKB Roche. <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/roche/2gfmpxkb>.
- (85) bioMérieux. BIOFIRE® FILMARRAY® SYSTEMS. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/biofire-filmarray-systems> (accessed 2022-11-30).
- (86) Pardo, J.; Klinker, K. P.; Borgert, S. J.; Butler, B. M.; Giglio, P. G.; Rand, K. H. Clinical and Economic Impact of Antimicrobial Stewardship Interventions with the FilmArray Blood Culture Identification Panel. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2016**, *84* (2), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.023>.
- (87) Soucek, D. K.; Dumkow, L. E.; VanLangen, K. M.; Jameson, A. P. Cost Justification of the BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel Versus Standard of Care for Diagnosing Meningitis in a Community Hospital. *Journal of Pharmacy Practice* **2019**, *32* (1), 36–40. <https://doi.org/10.1177/0897190017737697>.
- (88) Tan K. E.; Ellis B. C.; Lee R.; Stamper P. D.; Zhang S. X.; Carroll K. C. Prospective Evaluation of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System in a Hospital Clinical Microbiology Laboratory for Identification of Bacteria and Yeasts: A Bench-by-Bench Study for Assessing the Impact on Time to Identification and Cost-Effectiveness. *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50* (10), 3301–3308. <https://doi.org/10.1128/JCM.01405-12>.
- (89) Oviaño, M. Rapid Identification of Microorganisms Directly from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2019**, *37* (5), 287–289. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.12.007>.

- (90) Biotechne. Don't Let Cost Prevent You from Automating Your Western Blotting Workflows! <https://www.bio-techne.com/instruments/simple-western/automated-simple-western-blot-analysis-cost>.
- (91) White Diamond Research. Why Hospitals Are Not Buying The T2 Biosystems Diagnostic System - \$1.50 1-Year Price Target. https://seekingalpha.com/article/4246254-why-hospitals-are-not-buying-t2-biosystems-diagnostic-system-1_50-1-year-price-target.
- (92) Pfaller, M. A.; Wolk, D. M.; Lowery, T. J. T2MR and T2Candida: Novel Technology for the Rapid Diagnosis of Candidemia and Invasive Candidiasis. *Future Microbiology* **2016**, *11* (1), 103–117. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.111>.
- (93) Mulani, M. S.; Kamble, E. E.; Kumkar, S. N.; Tawre, M. S.; Pardesi, K. R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>.
- (94) Friedheim, E.; Michaelis, L. POTENTIOMETRIC STUDY OF PYOCYANINE. *Journal of Biological Chemistry* **1931**, *91* (1), 355–368. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)76619-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)76619-2).
- (95) Webster, T. A.; Sismaet, H. J.; Conte, J. L.; Chan, I. J.; Goluch, E. D. Electrochemical Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* in Human Fluid Samples via Pyocyanin. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *60*, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.028>.
- (96) Oziat, J.; Gougis, M.; Malliaras, G. G.; Mailley, P. Electrochemical Characterizations of Four Main Redox–Metabolites of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Electroanalysis* **2017**, *29* (5), 1332–1340. <https://doi.org/10.1002/elan.201600799>.
- (97) Elkhawaga, A. A.; Khalifa, M. M.; El-badawy, O.; Hassan, M. A.; El-Said, W. A. Rapid and Highly Sensitive Detection of Pyocyanin Biomarker in Different *Pseudomonas Aeruginosa* Infections Using Gold Nanoparticles Modified Sensor. *PLOS ONE* **2019**, *14* (7), e0216438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216438>.
- (98) Alatraktchi, F. A.; Johansen, H. K.; Molin, S.; Svendsen, W. E. Electrochemical Sensing of Biomarker for Diagnostics of Bacteria-Specific Infections. *Nanomedicine* **2016**, *11* (16), 2185–2195. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0155>.
- (99) Sismaet, H. J.; Pinto, A. J.; Goluch, E. D. Electrochemical Sensors for Identifying Pyocyanin Production in Clinical *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *97*, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.042>.
- (100) Jarošová, R.; McClure, S. E.; Gajda, M.; Jović, M.; Girault, H. H.; Lesch, A.; Maiden, M.; Waters, C.; Swain, G. M. Inkjet-Printed Carbon Nanotube Electrodes for Measuring Pyocyanin and Uric Acid in a Wound Fluid Simulant and Culture Media. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (14), 8835–8844. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05591>.

- (101) Alatraktchi, F. A.; Noori, J. S.; Tanev, G. P.; Mortensen, J.; Dimaki, M.; Johansen, H. K.; Madsen, J.; Molin, S.; Svendsen, W. E. Paper-Based Sensors for Rapid Detection of Virulence Factor Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *PLOS ONE* **2018**, *13* (3), e0194157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194157>.
- (102) Simoska, O.; Sans, M.; Fitzpatrick, M. D.; Crittenden, C. M.; Eberlin, L. S.; Shear, J. B.; Stevenson, K. J. Real-Time Electrochemical Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* Phenazine Metabolites Using Transparent Carbon Ultramicroelectrode Arrays. *ACS Sens.* **2019**, *4* (1), 170–179. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01152>.
- (103) Elliott, J.; Simoska, O.; Karasik, S.; Shear, J. B.; Stevenson, K. J. Transparent Carbon Ultramicroelectrode Arrays for the Electrochemical Detection of a Bacterial Warfare Toxin, Pyocyanin. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (12), 6285–6289. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00876>.
- (104) Oziat, J.; Cohu, T.; Elsen, S.; Gougis, M.; Malliaras, G. G.; Mailley, P. Electrochemical Detection of Redox Molecules Secreted by *Pseudomonas Aeruginosa* – Part 1: Electrochemical Signatures of Different Strains. *Bioelectrochemistry* **2021**, *140*, 107747. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107747>.
- (105) Zhang, W.; Tang, H.; Geng, P.; Wang, Q.; Jin, L.; Wu, Z. Amperometric Method for Rapid Detection of *Escherichia Coli* by Flow Injection Analysis Using a Bismuth Nano-Film Modified Glassy Carbon Electrode. *Electrochemistry Communications* **2007**, *9* (4), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.11.019>.
- (106) Geng, P.; Zheng, J.; Zhang, X.; Wang, Q.; Zhang, W.; Jin, L.; Feng, Z.; Wu, Z. Rapid Detection of *Escherichia Coli* by Flow Injection Analysis Coupled with Amperometric Method Using an IrO₂–Pd Chemically Modified Electrode. *Electrochemistry Communications* **2007**, *9* (9), 2157–2162. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.05.023>.
- (107) Yemini, M.; Levi, Y.; Yagil, E.; Rishpon, J. Specific Electrochemical Phage Sensing for *Bacillus Cereus* and *Mycobacterium Smegmatis*. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70* (1), 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.014>.
- (108) Sun, J.; Warden, A. R.; Huang, J.; Wang, W.; Ding, X. Colorimetric and Electrochemical Detection of *Escherichia Coli* and Antibiotic Resistance Based on a P-Benzoquinone-Mediated Bioassay. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (12), 7524–7530. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04997>.
- (109) Ibupoto, Z. H.; Jamal, N.; Khun, K.; Willander, M. Development of a Disposable Potentiometric Antibody Immobilized ZnO Nanotubes Based Sensor for the Detection of C-Reactive Protein. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *166–167*, 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.083>.

- (110) Lee, C.-W.; Chang, H.-Y.; Wu, J.-K.; Tseng, F.-G. Ultra-Sensitive Electrochemical Detection of Bacteremia Enabled by Redox-Active Gold Nanoparticles (RaGNPs) in a Nano-Sieving Microfluidic System (NS-MFS). *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *133*, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.040>.
- (111) Bhardwaj, J.; Devarakonda, S.; Kumar, S.; Jang, J. Development of a Paper-Based Electrochemical Immunosensor Using an Antibody-Single Walled Carbon Nanotubes Bio-Conjugate Modified Electrode for Label-Free Detection of Foodborne Pathogens. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *253*, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.108>.
- (112) Afonso, A. S.; Pérez-López, B.; Faria, R. C.; Mattoso, L. H. C.; Hernández-Herrero, M.; Roig-Sagués, A. X.; Maltez-da Costa, M.; Merkoçi, A. Electrochemical Detection of *Salmonella* Using Gold Nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *40* (1), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.054>.
- (113) Viswanathan, S.; Rani, C.; Ho, J. A. Electrochemical Immunosensor for Multiplexed Detection of Food-Borne Pathogens Using Nanocrystal Bioconjugates and MWCNT Screen-Printed Electrode. *Talanta* **2012**, *94*, 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.049>.
- (114) Villamizar, R. A.; Maroto, A.; Rius, F. X.; Inza, I.; Figueras, M. J. Fast Detection of *Salmonella Infantis* with Carbon Nanotube Field Effect Transistors. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24* (2), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.046>.
- (115) Nemr, C. R.; Smith, S. J.; Liu, W.; Mephram, A. H.; Mohamadi, R. M.; Labib, M.; Kelley, S. O. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (4), 2847–2853. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04792>.
- (116) Panhwar, S.; Ilhan, H.; Hassan, S. S.; Zengin, A.; Boyacı, I. H.; Tamer, U. Dual Responsive Disposable Electrode for the Enumeration of *Escherichia Coli* in Whole Blood. *Electroanalysis* **2020**, *32* (10), 2244–2252. <https://doi.org/10.1002/elan.202060185>.
- (117) Radke, S. M.; Alocilja, E. C. A High Density Microelectrode Array Biosensor for Detection of *E. Coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20* (8), 1662–1667. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.07.021>.
- (118) de la Rica, R.; Baldi, A.; Fernández-Sánchez, C.; Matsui, H. Selective Detection of Live Pathogens via Surface-Confined Electric Field Perturbation on Interdigitated Silicon Transducers. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (10), 3830–3835. <https://doi.org/10.1021/ac9001854>.
- (119) Das, R. D.; RoyChaudhuri, C.; Maji, S.; Das, S.; Saha, H. Macroporous Silicon Based Simple and Efficient Trapping Platform for Electrical Detection of *Salmonella Typhimurium* Pathogens.

- Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (11), 3215–3222.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.04.014>.
- (120) Varshney, M.; Li, Y. Interdigitated Array Microelectrode Based Impedance Biosensor Coupled with Magnetic Nanoparticle–Antibody Conjugates for Detection of *Escherichia Coli* O157:H7 in Food Samples. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22* (11), 2408–2414.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.030>.
- (121) Yang, L.; Li, Y.; Erf, G. F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of *Escherichia Coli* O157:H7. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (4), 1107–1113.
<https://doi.org/10.1021/ac0352575>.
- (122) Geng, P.; Zhang, X.; Meng, W.; Wang, Q.; Zhang, W.; Jin, L.; Feng, Z.; Wu, Z. Self-Assembled Monolayers-Based Immunosensor for Detection of *Escherichia Coli* Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (14), 4663–4668.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.01.037>.
- (123) Majumdar, T.; Chakraborty, R.; Raychaudhuri, U. Development of PEI-GA Modified Antibody Based Sensor for the Detection of *S. Aureus* in Food Samples. *Food Bioscience* **2013**, *4*, 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.08.002>.
- (124) Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. Electrochemical Immunosensor Designs for the Determination of *Staphylococcus Aureus* Using 3,3-Dithiodipropionic Acid Di(N-Succinimidyl Ester)-Modified Gold Electrodes. *Talanta* **2008**, *77* (2), 876–881. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.045>.
- (125) Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. Immunosensor for the Determination of *Staphylococcus Aureus* Using a Tyrosinase–Mercaptopropionic Acid Modified Electrode as an Amperometric Transducer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391* (3), 837. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1810-1>.
- (126) Lu, Y.-C.; Chuang, Y.-S.; Chen, Y.-Y.; Shu, A.-C.; Hsu, H.-Y.; Chang, H.-Y.; Yew, T.-R. Bacteria Detection Utilizing Electrical Conductivity. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *23* (12), 1856–1861. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.005>.
- (127) El Ichi, S.; Leon, F.; Vossier, L.; Marchandin, H.; Errachid, A.; Coste, J.; Jaffrezic-Renault, N.; Fournier-Wirth, C. Microconductometric Immunosensor for Label-Free and Sensitive Detection of Gram-Negative Bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *54*, 378–384.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.016>.
- (128) Hernández, R.; Vallés, C.; Benito, A. M.; Maser, W. K.; Xavier Rius, F.; Riu, J. Graphene-Based Potentiometric Biosensor for the Immediate Detection of Living Bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *54*, 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.053>.

- (129) Zelada-Guillén, G. A.; Sebastián-Avila, J. L.; Blondeau, P.; Riu, J.; Rius, F. X. Label-Free Detection of *Staphylococcus Aureus* in Skin Using Real-Time Potentiometric Biosensors Based on Carbon Nanotubes and Aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *31* (1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.021>.
- (130) Reali, S.; Najib, E. Y.; Treuerné Balázs, K. E.; Chern Hui Tan, A.; Váradi, L.; Hibbs, D. E.; Groundwater, P. W. Novel Diagnostics for Point-of-Care Bacterial Detection and Identification. *RSC Adv.* **2019**, *9* (37), 21486–21497. <https://doi.org/10.1039/C9RA03118A>.
- (131) Nazari-Vanani, R.; Sattarahmady, N.; Yadegari, H.; Heli, H. A Novel and Ultrasensitive Electrochemical DNA Biosensor Based on an Ice Crystals-like Gold Nanostructure for the Detection of *Enterococcus Faecalis* Gene Sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, *166*, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.025>.
- (132) Rahi, A.; Sattarahmady, N.; Heli, H. An Ultrasensitive Electrochemical Genosensor for *Brucella* Based on Palladium Nanoparticles. *Analytical Biochemistry* **2016**, *510*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.07.012>.
- (133) Gao, J.; Jeffries, L.; Mach, K. E.; Craft, D. W.; Thomas, N. J.; Gau, V.; Liao, J. C.; Wong, P. K. A Multiplex Electrochemical Biosensor for Bloodstream Infection Diagnosis. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* **2016**, *22* (4), 466–474. <https://doi.org/10.1177/2211068216651232>.
- (134) Jault, P.; Leclerc, T.; Jennes, S.; Pirnay, J. P.; Que, Y.-A.; Resch, G.; Rousseau, A. F.; Ravat, F.; Carsin, H.; Le Floch, R.; Schaal, J. V.; Soler, C.; Fevre, C.; Arnaud, I.; Bretaudeau, L.; Gabard, J. Efficacy and Tolerability of a Cocktail of Bacteriophages to Treat Burn Wounds Infected by *Pseudomonas Aeruginosa* (PhagoBurn): A Randomised, Controlled, Double-Blind Phase 1/2 Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2019**, *19* (1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1).
- (135) Rehman, S.; Ali, Z.; Khan, M.; Bostan, N.; Naseem, S. The Dawn of Phage Therapy. *Reviews in Medical Virology* **2019**, *29* (4), e2041. <https://doi.org/10.1002/rmv.2041>.
- (136) Loessner M J; Busse M. Bacteriophage Typing of *Listeria* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **1990**, *56* (6), 1912–1918. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1912-1918.1990>.
- (137) Shabani, A.; Zourob, M.; Allain, B.; Marquette, C. A.; Lawrence, M. F.; Mandeville, R. Bacteriophage-Modified Microarrays for the Direct Impedimetric Detection of Bacteria. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (24), 9475–9482. <https://doi.org/10.1021/ac801607w>.
- (138) Mejri, M. B.; Baccar, H.; Baldrich, E.; Del Campo, F. J.; Helali, S.; Ktari, T.; Simonian, A.; Aouni, M.; Abdelghani, A. Impedance Biosensing Using Phages for Bacteria Detection: Generation of Dual Signals as the Clue for in-Chip Assay Confirmation. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26* (4), 1261–1267. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.054>.

- (139) Shabani, A.; Marquette, C. A.; Mandeville, R.; Lawrence, M. F. Carbon Microarrays for the Direct Impedimetric Detection of *Bacillus Anthracis* Using Gamma Phages as Probes. *Analyst* **2013**, *138* (5), 1434–1440. <https://doi.org/10.1039/C3AN36830K>.
- (140) Kim, Y.-H.; Park, J.-S.; Jung, H.-I. An Impedimetric Biosensor for Real-Time Monitoring of Bacterial Growth in a Microbial Fermentor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *138* (1), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.034>.
- (141) Ward, A. C.; Hannah, A. J.; Kendrick, S. L.; Tucker, N. P.; MacGregor, G.; Connolly, P. Identification and Characterisation of *Staphylococcus Aureus* on Low Cost Screen Printed Carbon Electrodes Using Impedance Spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *110*, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.048>.
- (142) Muñoz-Berbel, X.; Vigués, N.; Jenkins, A. T. A.; Mas, J.; Muñoz, F. J. Impedimetric Approach for Quantifying Low Bacteria Concentrations Based on the Changes Produced in the Electrode–Solution Interface during the Pre-Attachment Stage. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *23* (10), 1540–1546. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.007>.
- (143) Suehiro, J.; Yatsunami, R.; Hamada, R.; Hara, M. Quantitative Estimation of Biological Cell Concentration Suspended in Aqueous Medium by Using Dielectrophoretic Impedance Measurement Method. *Journal of Physics D: Applied Physics* **1999**, *32* (21), 2814–2820. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/32/21/316>.
- (144) Wang, R.; Wang, L.; Yan, J.; Luan, D.; Tao sun; Wu, J.; Bian, X. Rapid, Sensitive and Label-Free Detection of Pathogenic Bacteria Using a Bacteria-Imprinted Conducting Polymer Film-Based Electrochemical Sensor. *Talanta* **2021**, *226*, 122135. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122135>.
- (145) Chen, J.; Jiang, Z.; Ackerman, J. D.; Yazdani, M.; Hou, S.; Nugen, S. R.; Rotello, V. M. Electrochemical Nanoparticle–Enzyme Sensors for Screening Bacterial Contamination in Drinking Water. *Analyst* **2015**, *140* (15), 4991–4996. <https://doi.org/10.1039/C5AN00637F>.
- (146) de la Rica, R.; Baldi, A.; Fernández-Sánchez, C.; Matsui, H. Single-Cell Pathogen Detection with a Reverse-Phase Immunoassay on Impedimetric Transducers. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (18), 7732–7736. <https://doi.org/10.1021/ac901210f>.
- (147) Andriukonis, E.; Celiesiute-Germaniene, R.; Ramanavicius, S.; Viter, R.; Ramanavicius, A. From Microorganism-Based Amperometric Biosensors towards Microbial Fuel Cells. *Sensors* **2021**, *21* (7). <https://doi.org/10.3390/s21072442>.
- (148) Cinquin, P.; Gondran, C.; Giroud, F.; Mazabrard, S.; Pellissier, A.; Boucher, F.; Alcaraz, J.-P.; Gorgy, K.; Lenouvel, F.; Mathé, S.; Porcu, P.; Cosnier, S. A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. *PLOS ONE* **2010**, *5* (5), e10476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010476>.

- (149) Philippon, T. Développement et Étude Des Bio-Cathodes Dénitrifiantes Dans Le Contexte de La Dépollution Des Zones Humides, **2021**. <http://www.theses.fr/2021REN1S084/document>.
- (150) Park, J.-H.; Kang, H.-J.; Park, K.-H.; Park, H.-D. Direct Interspecies Electron Transfer via Conductive Materials: A Perspective for Anaerobic Digestion Applications. *Bioresource Technology* **2018**, *254*, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.095>.
- (151) Gougis, M.; Marcoux, P. SYSTEM INCLUDING A BOX AND AN INSTRUMENTED CONTAINER FOR DETECTING THE PRESENCE OF MICRO-ORGANISMS IN A LIQUID SAMPLE. *WO Patent EP2020/072947*.

Bibliographie du Chapitre 2

- (1) Madigan, M.; Martinko, J. Brock Biologie Des Micro-Organismes, 11th Edition.; Pearson Education Inc./Prentice Hall.
- (2) Khatoon, Z.; McTiernan, C. D.; Suuronen, E. J.; Mah, T.-F.; Alarcon, E. I. Bacterial Biofilm Formation on Implantable Devices and Approaches to Its Treatment and Prevention. *Heliyon* **2018**, *4* (12), e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>.
- (3) Yan, J.; Bassler, B. L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe* **2019**, *26* (1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>.
- (4) Gupta, P.; Sarkar, S.; Das, B.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. Biofilm, Pathogenesis and Prevention— a Journey to Break the Wall: A Review. *Archives of Microbiology* **2016**, *198* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>.
- (5) Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2010**, *2* (5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- (6) Madigan, M.; Martinko, J. Biologie Des Micro-Organismes; Brock.
- (7) Thorpe T C; Wilson M L; Turner J E; DiGuseppi J L; Willert M; Mirrett S; Reller L B. BacT/Alert: An Automated Colorimetric Microbial Detection System. *Journal of Clinical Microbiology* **1990**, *28* (7), 1608–1612. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.7.1608-1612.1990>.
- (8) Turner, J.; Thorpe, T.; Di Guiseppi, J.; Driscoll, R. Device for Detecting Microorganisms. *US4945060A*.
- (9) Priyam Study Centre. Glass Electrode. Learning Chemistry. <https://www.priyamstudycentre.com/2022/05/glass-electrode-ph-measurement.html> (accessed 2022-12-05).

- (10) Colburn, A. W.; Levey, K. J.; O'Hare, D.; Macpherson, J. V. Lifting the Lid on the Potentiostat: A Beginner's Guide to Understanding Electrochemical Circuitry and Practical Operation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23* (14), 8100–8117. <https://doi.org/10.1039/D1CP00661D>.
- (11) Furst, A. L.; Francis, M. B. Impedance-Based Detection of Bacteria. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 700–726. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00381>.
- (12) Chmayssem, A.; Verplanck, N.; Tanase, C. E.; Costa, G.; Monsalve-Grijalba, K.; Amigues, S.; Alias, M.; Gougis, M.; Mourier, V.; Vignoud, S.; Ghaemmaghami, A. M.; Mailley, P. Development of a Multiparametric (Bio)Sensing Platform for Continuous Monitoring of Stress Metabolites. *Talanta* **2021**, *229*, 122275. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122275>.
- (13) Karyakin, A. A.; Strakhova, A. K.; Yatsimirsky, A. K. Self-Doped Polyanilines Electrochemically Active in Neutral and Basic Aqueous Solutions: Electropolymerization of Substituted Anilines. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, *371* (1), 259–265. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)03244-J](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)03244-J).
- (14) Macdiarmid, A. G.; Chiang, J. C.; Richter, A. F.; Epstein, A. J. Polyaniline: A New Concept in Conducting Polymers. *Synthetic Metals* **1987**, *18* (1), 285–290. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(87\)90893-9](https://doi.org/10.1016/0379-6779(87)90893-9).
- (15) Cooper, J. C.; Hall, E. A. H. Electrochemical Response of an Enzyme-Loaded Polyaniline Film. *Biosensors and Bioelectronics* **1992**, *7* (7), 473–485. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(92\)80004-U](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)80004-U).
- (16) Khalifa, M. M.; Elkhawaga, A. A.; Hassan, M. A.; Zahran, A. M.; Fathalla, A. M.; El-Said, W. A.; El-Badawy, O. Highly Specific Electrochemical Sensing of *Pseudomonas Aeruginosa* in Patients Suffering from Corneal Ulcers: A Comparative Study. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 18320. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54667-0>.
- (17) Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. Application of Conducting Polymers to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, *17* (5), 345–359. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00312-8).
- (18) Shoaie, N.; Daneshpour, M.; Azimzadeh, M.; Mahshid, S.; Khoshfetrat, S. M.; Jahanpeyma, F.; Gholaminejad, A.; Omidfar, K.; Foruzandeh, M. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on the Use of Polyaniline and Its Nanocomposites: A Review on Recent Advances. *Microchimica Acta* **2019**, *186* (7), 465. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3588-1>.
- (19) Karyakin, A. A.; Vuki, M.; Lukachova, L. V.; Karyakina, E. E.; Orlov, A. V.; Karpachova, G. P.; Wang, J. PROCESSIBLE POLYANILINE AS AN ADVANCED POTENTIOMETRIC PH TRANSDUCER. APPLICATION TO BIOSENSORS. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 2534–2540. <https://doi.org/10.1021/ac981337a>.

- (20) Jin, Z.; Su, Y.; Duan, Y. An Improved Optical PH Sensor Based on Polyaniline. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, *71* (1), 118–122. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00597-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00597-9).
- (21) Ge, C.; Armstrong, N. R.; Saavedra, S. S. PH-Sensing Properties of Poly(Aniline) Ultrathin Films Self-Assembled on Indium–Tin Oxide. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (4), 1401–1410. <https://doi.org/10.1021/ac061740e>.
- (22) Martin, N. C.; Pirie, A. A.; Ford, L. V.; Callaghan, C. L.; McTurk, K.; Lucy, D.; Scrimger, D. G. The Use of Phosphate Buffered Saline for the Recovery of Cells and Spermatozoa from Swabs. *Science & Justice* **2006**, *46* (3), 179–184. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(06\)71591-X](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(06)71591-X).
- (23) Carroll, S.; Baldwin, R. P. Self-Calibrating Microfabricated Iridium Oxide PH Electrode Array for Remote Monitoring. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (3), 878–885. <https://doi.org/10.1021/ac9020374>.
- (24) Byrd, H.; Chapman, B. E.; Talley, C. L. Prussian Blue Coated Electrode as a Sensor for Electroinactive Cations in Aqueous Solutions. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90* (6), 775–777. <https://doi.org/10.1021/ed3008318>.
- (25) Karyakin, A. A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis* **2001**, *13* (10), 813–819. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200106\)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200106)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z).
- (26) Lamy, B. Automates Pour HémoCulture en 2005. *BioTribune Magazine* **2005**, *16* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/BF03013617>.
- (27) BACT/ALERT® FA PLUS. <https://biomerieuxdirect.com/>. <https://biomerieuxdirect.com/clinical/Bacteriology/Blood-Culture/Bac-T-Alert-system/BTA-Bottles-Standard/BacT-Alert-Reagents-Other/BACT-ALERT%C2%AE-FA-PLUS/p/410851>.
- (28) Karlowsky, J. A.; Jones, M. E.; Draghi, D. C.; Thornsberry, C.; Sahm, D. F.; Volturo, G. A. Prevalence and Antimicrobial Susceptibilities of Bacteria Isolated from Blood Cultures of Hospitalized Patients in the United States in 2002. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **2004**, *3* (1), 7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-3-7>.

Bibliographie du Chapitre 3

- (1) Shrestha, N. K.; Lim, S. H.; Wilson, D. A.; SalasVargas, A. V.; Churi, Y. S.; Rhodes, P. A.; Mazzone, P. J.; Procop, G. W. The Combined Rapid Detection and Species-Level Identification of Yeasts in Simulated Blood Culture Using a Colorimetric Sensor Array. *PLOS ONE* **2017**, *12* (3), e0173130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173130>.
- (2) Bonten, M.; Johnson, J. R.; van den Biggelaar, A. H. J.; Georgalis, L.; Geurtsen, J.; de Palacios, P. I.; Gravenstein, S.; Verstraeten, T.; Hermans, P.; Poolman, J. T. Epidemiology of *Escherichia Coli*

- Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases* **2021**, 72 (7), 1211–1219. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210>.
- (3) Rolfe Matthew D.; Rice Christopher J.; Lucchini Sacha; Pin Carmen; Thompson Arthur; Cameron Andrew D. S.; Alston Mark; Stringer Michael F.; Betts Roy P.; Baranyi József; Peck Michael W.; Hinton Jay C. D. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology* **2012**, 194 (3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>.
- (4) Gosselin, D.; Gougis, M.; Baque, M.; Navarro, F. P.; Belgacem, M. N.; Chaussy, D.; Bourdat, A.-G.; Mailley, P.; Berthier, J. Screen-Printed Polyaniline-Based Electrodes for the Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reactions. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (19), 10124–10128. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02394>.
- (5) Li, Z.; Liu, S.; Chen, H.; Zhang, X.; Ling, Y.; Zhang, N.; Hou, T. Comparative Evaluation of BACTEC FX, BacT/ALERT 3D, and BacT/ALERT VIRTUO Automated Blood Culture Systems Using Simulated Blood Cultures. *Acta Clinica Belgica* **2022**, 77 (1), 71–78. <https://doi.org/10.1080/17843286.2020.1797343>.
- (6) Yemini, M.; Levi, Y.; Yagil, E.; Rishpon, J. Specific Electrochemical Phage Sensing for *Bacillus Cereus* and *Mycobacterium Smegmatis*. *Bioelectrochemistry* **2007**, 70 (1), 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.014>.
- (7) Philippon, T. Développement et Étude Des Bio-Cathodes Dénitrifiantes Dans Le Contexte de La Dépollution Des Zones Humides, **2021**. <http://www.theses.fr/2021REN1S084/document>.
- (8) Wilkins, J. R.; Stoner, G. E. Microbial Detection and Enumeration Apparatus. US4200493A.
- (9) S. F. Cogan. In Vivo and In Vitro Differences in the Charge-Injection and Electrochemical Properties of Iridium Oxide Electrodes. In *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*; **2006**; pp 882–885. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.259654>.
- (10) Paglia, G.; D’Alessandro, A.; Rolfsson, Ó.; Sigurjónsson, Ó. E.; Bordbar, A.; Palsson, S.; Nemkov, T.; Hansen, K. C.; Gudmundsson, S.; Palsson, B. O. Biomarkers Defining the Metabolic Age of Red Blood Cells during Cold Storage. *Blood* **2016**, 128 (13), e43–e50. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-721688>.
- (11) Kanas, T.; Acker, J. P. Biopreservation of Red Blood Cells – the Struggle with Hemoglobin Oxidation. *The FEBS Journal* **2010**, 277 (2), 343–356. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07472.x>.
- (12) D’Alessandro, A.; Culp-Hill, R.; Reisz, J. A.; Anderson, M.; Fu, X.; Nemkov, T.; Gehrke, S.; Zheng, C.; Kanas, T.; Guo, Y.; Page, G.; Gladwin, M. T.; Kleinman, S.; Lanteri, M.; Stone, M.; Busch, M.;

- Zimring, J. C.; for the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS-III). Heterogeneity of Blood Processing and Storage Additives in Different Centers Impacts Stored Red Blood Cell Metabolism as Much as Storage Time: Lessons from REDS-III—Omics. *Transfusion* **2019**, *59* (1), 89–100. <https://doi.org/10.1111/trf.14979>.
- (13) Roch, A.; Magon, N. J.; Maire, J.; Suarna, C.; Ayer, A.; Waldvogel, S.; Imhof, B. A.; Koury, M. J.; Stocker, R.; Schapira, M. Transition to 37°C Reveals Importance of NADPH in Mitigating Oxidative Stress in Stored RBCs. *JCI Insight* **2019**, *4* (21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126376>.
- (14) Cooper, S.; Helmstetter, C. E. Chromosome Replication and the Division Cycle of Escherichia Coli Br. *Journal of Molecular Biology* **1968**, *31* (3), 519–540. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90425-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90425-7).
- (15) Lamy, B. Automates Pour Hémoculture en 2005. *BioTribune Magazine* **2005**, *16* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/BF03013617>.
- (16) Soutar, C. D.; Stavrinides, J. Phylogenetic Analysis Supporting the Taxonomic Revision of Eight Genera within the Bacterial Order Enterobacterales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2020**, *70*, 6524–6530. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004542>.
- (17) Madigan, M.; Martinko, J. *Biologie Des Micro-Organismes*; Brock.
- (18) Mulani, M. S.; Kamble, E. E.; Kumkar, S. N.; Tawre, M. S.; Pardesi, K. R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>.
- (19) Diekema Daniel J.; Hsueh Po-Ren; Mendes Rodrigo E.; Pfaller Michael A.; Rolston Kenneth V.; Sader Helio S.; Jones Ronald N. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2019**, *63* (7), e00355-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00355-19>.
- (20) Agaba, P.; Tumukunde, J.; Tindimwebwa, J. V. B.; Kwizera, A. Nosocomial Bacterial Infections and Their Antimicrobial Susceptibility Patterns among Patients in Ugandan Intensive Care Units: A Cross Sectional Study. *BMC Research Notes* **2017**, *10* (1), 349. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2695-5>.
- (21) Tolera, M.; Abate, D.; Dheresa, M.; Marami, D. Bacterial Nosocomial Infections and Antimicrobial Susceptibility Pattern among Patients Admitted at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. *Advances in Medicine* **2018**, *2018*, 2127814. <https://doi.org/10.1155/2018/2127814>.
- (22) Orsini, J.; Mainardi, C.; Muzylo, E.; Karki, N.; Cohen, N.; Sakoulas, G. Microbiological Profile of Organisms Causing Bloodstream Infection in Critically Ill Patients. *Journal of Clinical Medicine Research*; Vol. 4, No. 6, Dec 2012 **2012**.

- (23) LE ROUX Joël. La transformée de Fourier et ses applications (partie 1). *Techniques de l'ingénieur Mathématiques* **2007**, base documentaire : TIP052WEB (ref. article : af1440). <https://doi.org/10.51257/a-v1-af1440>.

Bibliographie du Chapitre 4

- (1) Levy, O. Antimicrobial Proteins and Peptides of Blood: Templates for Novel Antimicrobial Agents. *Blood* **2000**, *96* (8), 2664–2672. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.8.2664>.
- (2) Minasyan, H. Erythrocyte and Blood Antibacterial Defense. *European Journal of Microbiology and Immunology EuJMI* **2014**, *4* (2), 138–143. <https://doi.org/10.1556/eujmi.4.2014.2.7>.
- (3) Roch, A.; Magon, N. J.; Maire, J.; Suarna, C.; Ayer, A.; Waldvogel, S.; Imhof, B. A.; Koury, M. J.; Stocker, R.; Schapira, M. Transition to 37°C Reveals Importance of NADPH in Mitigating Oxidative Stress in Stored RBCs. *JCI Insight* **2019**, *4* (21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126376>.
- (4) Horbett, T. A. Fibrinogen Adsorption to Biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2018**, *106* (10), 2777–2788. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36460>.
- (5) Willey; Sherwood; Woolverton. Prescott - Microbiology; Prescott.
- (6) Manna, S.; Ghanty, C.; Baidara, P.; Barik, T. KR.; Mandal, S. M. Electrochemical Communication in Biofilm of Bacterial Community. *Journal of Basic Microbiology* **2020**, *60* (10), 819–827. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000340>.
- (7) Marsili, E.; Baron, D. B.; Shikhare, I. D.; Coursolle, D.; Gralnick, J. A.; Bond, D. R. Shewanella Secretes Flavins That Mediate Extracellular Electron Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (10), 3968–3973. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105>.
- (8) Deng, L.; Li, F.; Zhou, S.; Huang, D.; Ni, J. A Study of Electron-Shuttle Mechanism in Klebsiella Pneumoniae Based-Microbial Fuel Cells. *Chinese Science Bulletin* **2010**, *55* (1), 99–104. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0563-y>.
- (9) Reguera, G.; McCarthy, K. D.; Mehta, T.; Nicoll, J. S.; Tuominen, M. T.; Lovley, D. R. Extracellular Electron Transfer via Microbial Nanowires. *Nature* **2005**, *435* (7045), 1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>.
- (10) Darvishi, S.; Tavakoli, S.; Kharaziha, M.; Girault, H. H.; Kaminski, C. F.; Mela, I. Advances in the Sensing and Treatment of Wound Biofilms. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61* (13), e202112218. <https://doi.org/10.1002/anie.202112218>.
- (11) Guinovart, T.; Valdés-Ramírez, G.; Windmiller, J. R.; Andrade, F. J.; Wang, J. Bandage-Based Wearable Potentiometric Sensor for Monitoring Wound PH. *Electroanalysis* **2014**, *26* (6), 1345–1353. <https://doi.org/10.1002/elan.201300558>.

- (12) Poma, N.; Vivaldi, F.; Bonini, A.; Salvo, P.; Kirchhain, A.; Melai, B.; Bottai, D.; Tavanti, A.; Di Francesco, F. A Graphenic and Potentiometric Sensor for Monitoring the Growth of Bacterial Biofilms. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *323*, 128662. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128662>.
- (13) Liu, C.; Sun, T.; Zhai, Y.; Dong, S. Evaluation of Ferricyanide Effects on Microorganisms with Multi-Methods. *Talanta* **2009**, *78* (2), 613–617. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.019>.
- (14) Gosselin, D.; Gougis, M.; Baque, M.; Navarro, F. P.; Belgacem, M. N.; Chaussy, D.; Bourdat, A.-G.; Mailley, P.; Berthier, J. Screen-Printed Polyaniline-Based Electrodes for the Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reactions. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (19), 10124–10128. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02394>.

Bibliographie de la conclusion

- (1) Kerremans J. J.; van der Bij A. K.; Goessens W.; Verbrugh H. A.; Vos M. C. Needle-to-Incubator Transport Time: Logistic Factors Influencing Transport Time for Blood Culture Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **2009**, *47* (3), 819–822. <https://doi.org/10.1128/JCM.01829-08>.
- (2) Quintard, C. Développement d'un Dispositif Microfluidique Pour La Vascularisation Fonctionnelle d'organoïdes-Sur-Puce. Theses, *Université Grenoble Alpes*, **2022**. <https://theses.hal.science/tel-03867605>.
- (3) Madigan, M.; Martinko, J. Brock Biologie Des Micro-Organismes, 11th Edition.; Pearson Education Inc./Prentice Hall.
- (4) MODE D'EMPLOI - BD Middlebrook 7H10 Agar. BD September **2012**. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8851>.