

Application des techniques de Séparation de Sources à des spectres Raman issus de microorganismes

R. HUEZ¹, C. GOBINET¹, E. PERRIN¹, G. D. SOCKALINGUM², M. MANFAIT²

¹LAM, ²Unité MéDIAN, CNRS FRE2141, Université de Reims Champagne-Ardenne,
Campus du Moulin de la Housse, B.P. 1039, 51687 REIMS Cedex 2, FRANCE

regis.huez, cyril.gobinet, eric.perrin, ganesh.sockalingum, michel.manfait@univ-reims.fr

Résumé – Nous présentons dans ce papier une application biomédicale des techniques de Séparation Aveugle de Sources (SAS) à la séparation et à l'identification de Spectres Raman (SR) issus de micro-organismes. Dans l'étude de micro-organismes par spectroscopie Raman, la principale difficulté est de dissocier le SR des bactéries de celui du milieu de culture, les bactéries ayant besoin d'un milieu de culture pour être étudiées. Les méthodes classiques effectuent une mesure préliminaire du SR du milieu de culture et soustraient cette mesure au SR des bactéries sur leur milieu de culture. L'avantage majeur des techniques de SAS est l'extraction du SR des bactéries sans mesure préalable du milieu de culture, ce qui rend le SR des bactéries indépendant des variations du milieu de culture.

Abstract – We present in this paper a Blind Source Separation (BSS) application to the separation and identification of microorganism Raman spectra. In the study of micro organisms by Raman spectroscopy, the major difficulty is to dissociate the Raman spectrum (RS) of the bacteria from that of the solid culture medium, on which they grow. This is classically achieved by measuring the pure solid culture medium RS and subtracting its exact value from the bacteria and medium RS. The major advantage of the BSS techniques is the extraction of the bacterial RS without prior measurement from the pure solid culture medium, which permits to be independent of medium variations.

1. Introduction

L'objectif de ce travail est l'identification de signatures spectrales Raman d'un micro-organisme qui évolue sur un milieu de culture solide. La spectroscopie Raman est une technique bien adaptée à l'étude d'échantillons biologiques in situ. La difficulté majeure de cette approche est l'influence du milieu de culture sur le spectre des bactéries. Plusieurs méthodes ont été développées pour traiter ce problème mais la plupart d'entre elles ne réussissent pas à soustraire la contribution exacte du milieu de culture dans le signal total.

La première méthode consiste à mesurer le SR du milieu de culture et à le soustraire du SR mesuré (ou SR des bactéries sur leur milieu de culture). La validation de la solution obtenue est réalisée par une estimation du SR des bactéries dont la caractéristique principale est d'être presque plat à l'exception de quelques pics représentatifs correspondant aux espèces biologiques présentes dans la cellule bactérienne. Une méthode récemment développée est basée sur l'algèbre mathématique [1] et consiste à effectuer une projection du SR mesuré sur le SR du milieu de culture. La projection s'effectue sur une base orthogonale dont le SR du milieu de culture est l'un des axes, la projection sur le second axe de cette base est le SR recherché, celui des bactéries. Cette technique mène à une bonne détermination des SR des bactéries mais nécessite encore la mesure préliminaire du SR du milieu de culture.

L'approche présentée ici est différente, l'orthogonalité des SR des bactéries et du milieu de culture n'est pas le trait principal. Nous utilisons les techniques de SAS pour extraire les SR des bactéries et du milieu de culture. Les techniques de SAS requièrent plusieurs mélanges différents de sources

statistiquement indépendantes et sont capables de restituer les sources à partir de ces seuls mélanges. L'avantage de cette technique est de s'affranchir de la mesure préalable du SR du milieu de culture ce qui permettra d'obtenir un SR des bactéries plus précis et non subjectif.

2. Etude des bactéries par micro-spectroscopie Raman

2.1 Principe

L'usage de la spectroscopie par Transformée de Fourier Infrarouge (FTIR) pour l'identification et la caractérisation microbienne est couramment employée [2]. La micro spectroscopie Raman qui est complémentaire de la FTIR offre des mesures performantes du fait de sa résolution spatiale ($<2 \mu\text{m}$) et de sa non invasivité, elle est donc bien adaptée aux échantillons biologiques (quelques mm³). Dans notre étude, nous avons utilisé un micro-spectromètre Raman équipé d'une excitation laser à 632.8nm. Les bactéries étudiées ici sont sous dans la forme d'une microcolonie qui grandit sur un milieu de culture solide (Figure 1).

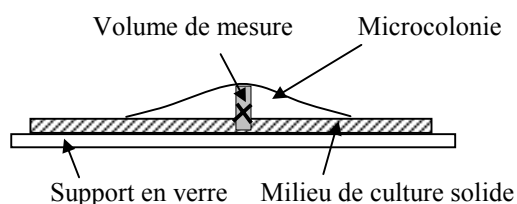


FIG. 1 : Principe

2.2 Définition du protocole de mesure

Nous illustrons ici l'exemple de bactéries *Staphylococcus aureus* sur un milieu de culture Mueller Hinton. Comme le volume de mesure intègre la microcolonie et le milieu de culture, l'obstacle majeur à cette approche est la présence de contributions du signal du milieu de culture dans le SR mesuré. Ce problème est dû à la profondeur de pénétration du laser. Nous avons réalisé un ensemble de mesures de la microcolonie, celles-ci commencent à partir de 6h après son dépôt sur le milieu de culture, le signal devenant significatif quand la colonie a atteint une certaine dimension. Selon le temps de culture, le diamètre de la microcolonie peut varier de quelques dizaines de microns (6h) à plusieurs centaines de microns (15h), son épaisseur au centre change de quelques microns à plusieurs dizaines de microns. La figure 2 représente une colonie en cours de croissance et montre une organisation de la population en différentes couches, les bactéries âgées sont au centre et les bactéries jeunes au dessus et en périphérie.

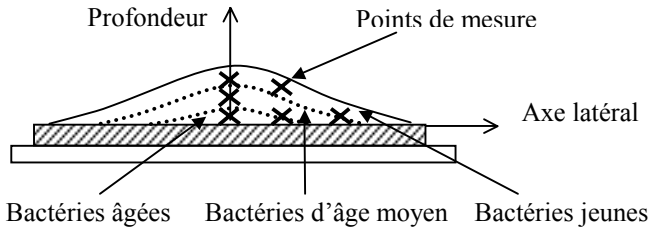


FIG. 2 : Protocole de mesure

Pour obtenir le SR estimé des bactéries, la soustraction du SR du milieu de culture présente 2 inconvénients : l'interaction « bactérie-milieu de culture » lors du dépôt de la microcolonie peut modifier le SR du milieu de culture et le milieu de culture peut évoluer pendant la mesure. Face à ce type de problème, les techniques de SAS peuvent apporter une solution.

3. Application des techniques de SAS aux spectres Raman

3.1 Principe des techniques de SAS

Les techniques de SAS [3] consistent à séparer plusieurs signaux statistiquement indépendants nommés sources à partir de différents mélanges linéaires de ces sources, les mélanges sont généralement appelés signaux capteurs. Trois conditions sont nécessaires pour appliquer ces techniques : les sources doivent être statistiquement indépendantes, le nombre de capteurs doit être supérieur ou égal au nombre de sources et il doit exister une matrice de mélange entre les sources et les capteurs. L'application expérimentale de ces techniques n'est pas évidente, elle nécessite souvent une adaptation du système et une définition particulière des sources, ce genre de travail a déjà été effectué sur des capteurs pyroélectriques [4] et des capteurs à courants de Foucault [5]. Le principe de la SAS est décrit sur la figure 3, les sources inconnues sont nommées S, les signaux capteurs observés X et les sources estimées Y.

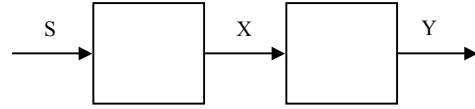


FIG. 3 : Principe de la SAS

La matrice de mélange entre les sources et les capteurs est nommée A et la matrice de séparation B.

Nous avons

$$B=A^{-1} \quad (1)$$

Cette formulation, propre à la SAS, introduit deux indéterminations sur la puissance des sources et leur ordre respectif.

3.2 Application à notre étude

Dans notre étude, les sources recherchées sont le SR du milieu de culture et le SR de la bactérie. Ils sont considérés comme statistiquement indépendants. Les signaux capteurs sont les SR mesurés.

La structure temporelle des données suggère l'utilisation de l'algorithme SOBI (Second Order Blind Identification), développé par Belouchrani [6]. C'est un algorithme classique de séparation de sources travaillant à l'ordre 2, il est adapté aux sources temporellement corrélées et se révèle très robuste. Il requiert les signaux observés X, le nombre de sources 'n' et le nombre 'p' de matrices de corrélations croisées avec délais. Le nombre de sources est supposé égal à deux, donc 'n=2', et l'emploi de cinq matrices de corrélations croisées avec délais est suffisant.

Il reste maintenant à définir le protocole expérimental pour obtenir des mélanges des sources. Sachant que l'intensité de la diffusion Raman est directement proportionnelle à la concentration des espèces diffusantes [7][8][9], trois types de mesures sont envisageables pour atteindre ce but :

- Des mesures en profondeur.

La contribution du SR du milieu de culture dans le volume de mesure décroît du bas vers le haut, et celle des bactéries augmente ; des mesures à différentes profondeurs fournissent des mélanges différents des spectres de la bactérie et du milieu. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.

- Des mesures en temps.

En un même point de mesure, le SR des bactéries se modifie en fonction du temps et se manifeste par une augmentation proportionnelle des pics en amplitude. Des mesures à des instants différents impliquent des mélanges différents. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 5.

- Des mesures latérales.

Le long de l'axe latéral, un phénomène similaire existe, les bactéries âgées étant situées au centre de la microcolonie et les plus jeunes à la périphérie. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 6.

4. Résultats

Les mesures réalisées en fonction de la profondeur, d'un déplacement latéral, du temps précédemment décrites sont

exploitées par l'algorithme SOBI et présentées ci-dessous. Une mesure préalable du spectre du milieu de culture a été réalisée et est similaire aux milieux de culture estimés sur les figures 4, 5 et 6. Les SR sont étudiés dans l'intervalle spectral allant de 400 à 1650 cm^{-1} et les intensités sont normalisées. La figure 4 concerne l'étude en fonction de la profondeur, la figure 5 l'étude en fonction d'un déplacement latéral et la figure 6 l'étude en fonction du temps. Les deux schémas situés dans la partie supérieure des figures sont les SR mesurés et les deux schémas situés dans la partie inférieure sont les SR estimés après l'application de l'algorithme SOBI.

4.1 Etude en fonction de la profondeur

Sur l'étude en fonction de la profondeur, les SR expérimentaux montrent clairement que l'influence du milieu de culture est beaucoup plus forte sur le SR mesuré à 3mm de profondeur que sur celui à 17mm. Cette différence nous fournit une matrice de mélange. Après application de l'algorithme de SAS, les sources restituées, qui sont les SR estimés du milieu et de la bactérie, sont en accord avec les prédictions. En effet, le spectre estimé de la bactérie est presque plat à l'exception de trois pics et le spectre estimé du milieu de culture est, de façon approximative, similaire à celui de la mesure préalable.

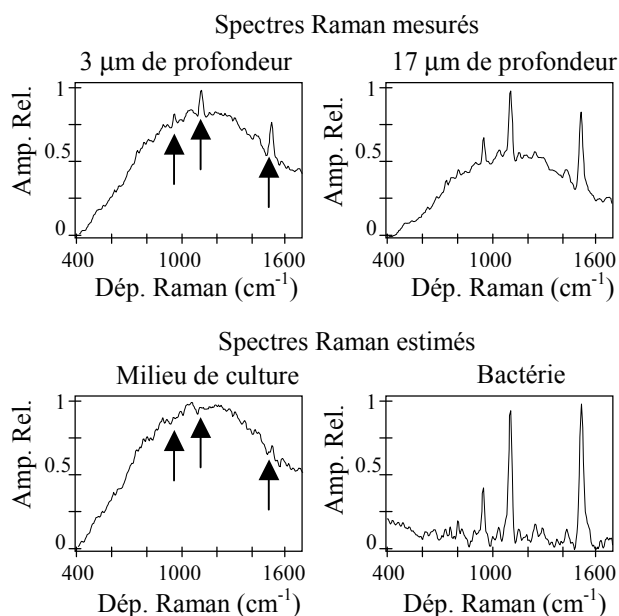


FIG. 4 : Mesures en fonction de la profondeur

4.2 Etude en fonction d'un déplacement latéral

L'étude en fonction d'un déplacement latéral est décrit sur la figure 5. Nous pouvons constater que les 3 pics caractéristiques de la bactérie et signalés par des flèches sur la figure 5 sont absents ou fortement atténués sur le SR estimé du milieu de culture. La différence de signal obtenue entre les spectres estimés par l'étude en fonction de la profondeur et l'étude en fonction d'un déplacement latéral provient de la caractéristique de ce type de mesures. Celles-ci sont effectuées sur des matériaux biologiques vivants, et bien

qu'une mesure intègre un volume de quelques mm^3 , il reste une certaine variabilité.

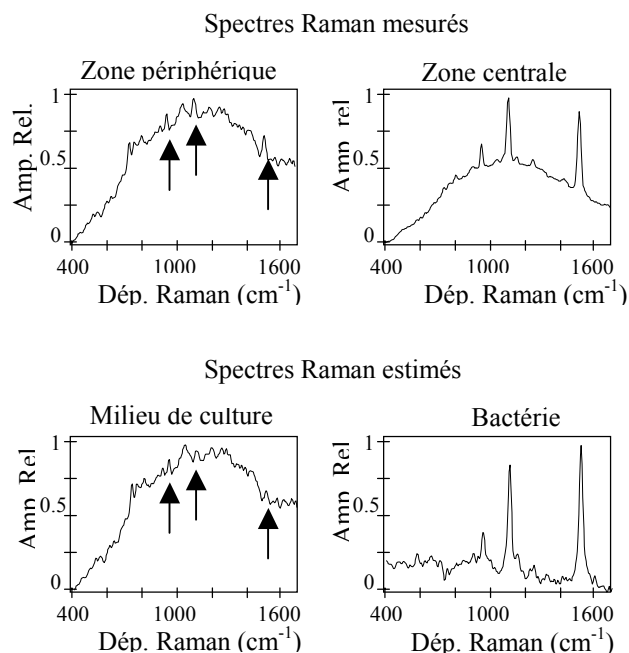


FIG. 5 : Mesures en fonction d'un déplacement latéral

4.3 Etude en fonction du temps

L'étude en fonction du temps est représentée sur la figure 6.

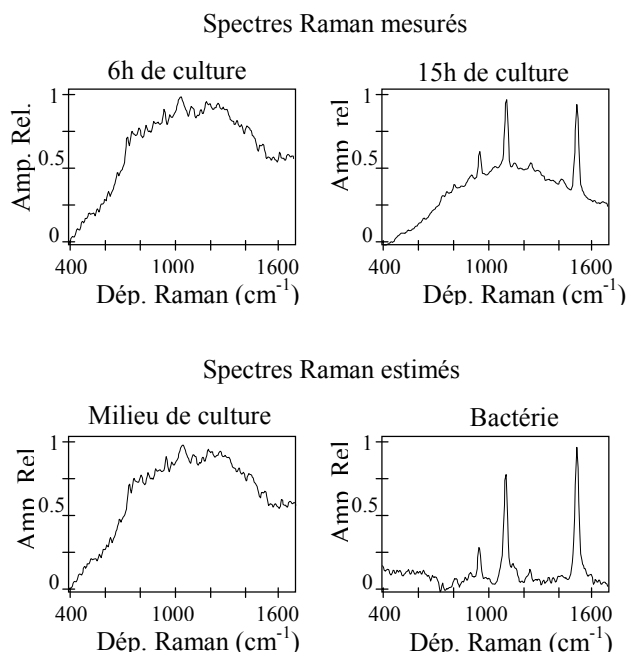


FIG. 6 : Mesures en fonction du temps

Nous remarquons que le SR obtenu après 6 heures semble similaire au spectre préliminaire du milieu. Les SR estimés sont en accord avec les prédictions. Une analyse de la matrice de mélange estimée fournit quelques précisions, elle confirme que le SR mesuré après 6 heures de culture est identique au SR du milieu de culture. Ainsi, après 6 heures de culture, la

présence des bactéries n'est pas visible sur les SR. Dans ce cas, l'utilisation de la SAS n'est pas justifiée.

Une étude plus approfondie montre que les différents SR estimés du milieu de culture ne sont jamais exactement similaires, ce qui a tend à justifier l'utilisation des techniques de SAS permettant la prise en compte du SR « réel » du milieu de culture. L'utilisation du spectre préalable dans notre approche n'aurait ainsi pas été judicieuse.

5. Conclusion

Ce travail a montré l'application d'une technique de SAS à la Spectroscopie Raman pour la caractérisation et l'identification de spectres Raman de bactéries. Les résultats obtenus démontrent clairement la possibilité d'extraire le spectre exact d'une bactérie de celui d'un milieu de culture à partir de mélanges de ces derniers uniquement. Ce résultat est d'une grande importance pour les biophysiciens puisqu'il permet de s'affranchir de la composition du milieu de culture et de la proportion de son influence dans les spectres expérimentaux, donc de s'affranchir d'une mesure préalable du spectre du milieu seul.

Références

- [1] K. Maquelin and al., "Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Micro-organisms Growing on Solid Culture Medium", *Analytical Chemistry*, Vol. 72, No. 1, pp. 12-19, January 1, 2000.
- [2] G. D. Sockalingum and al., *M. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 232, pp. 240-246, 1997.
- [3] J. F. Cardoso, A. Souloumiac, *Blind Beamforming for non Gaussian signals*, *IEE Proceedings-F*, Vol. 140, no 6, pp. 362-370, 1994.
- [4] R. Huez, D. Nuzillard, A. Billat, *Denoising using Blind Source Separation for pyroelectric sensors*, *EURASIP JASP*, Vol. 1, pp. 53-65, 2001.
- [5] R. Huez, F. Belloir and A. Billat, *Blind Source Separation Application to Smart Eddy Current Sensor for Metallic Tag Recognition*, *EUSIPCO'2000 Conference*, Tampere, Finland, Sept. 2000.
- [6] A. Belouchrani, K. Abed Meraim, J.F. Cardoso, E. Moulines, *A blind source separation technique using the second order statistics*, *IEEE Transaction on Signal Processing*, vol. 45, no 2, pp. 434-443, february 1997.
- [7] E. Porcheron, L. Thause, J. Malet, P. Cornet, P. Brun, J. Vendel *Application simultanée de la spectroscopie par Diffusion Raman Spontanée et de la PIV/LDV pour la caractérisation d'un écoulement air vapeur*, IRSN CEA Saclay
- [8] J. Schmidt, S. L. Zhang, K. H. Michaelian, M. A. Webb, and G. R. Loppnow, *Quantitation of Sulfur Oxyanions in Industrial Metal Refining Solutions with Dispersive and Fourier-Transform Raman Spectroscopy*, Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2G2 Canada.
- [9] B. L. Chadwick, D. Charlston-Goch, A. Campisi, and R. J. S. Morrison, *Flame Front Observation of Ammonia Decomposition and Oxidation Using 193 nm Two-Photon Photolysis and Photofragment Fluorescence*, Cooperative Research Centre for New Technologies for Power Generation from Low-Rank Coal, 8/677 Springvale Rd, Mulgrave, Victoria 3170 Australia.