

## Méthodes physiques d'extraction de micro-organismes à partir d'échantillons sanguins à l'aide de microsystèmes Émilie Bisceglia

#### ▶ To cite this version:

Émilie Bisceglia. Méthodes physiques d'extraction de micro-organismes à partir d'échantillons sanguins à l'aide de microsystèmes. Autre [cond-mat.other]. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2013. Français. NNT: 2013DENS0042. tel-00957785

### HAL Id: tel-00957785 https://theses.hal.science/tel-00957785

Submitted on 11 Mar 2014

**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. ENSC - 2013 N° 471



### THESE DE DOCTORAT DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

## Présentée par MIIe BISCEGLIA Emilie

### pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

2

5

Secteur disciplinaire Secteur disciplinaire secondaire

Physique

Sciences de la vie et de la santé

Méthodes physiques d'extraction de micro-organismes à partir d'échantillons sanguins à l'aide de microsystèmes



Thèse présentée et soutenue à Grenoble le 7 novembre 2013 devant le jury composé de :

M. Philippe REN AUD Mme Marie-Pierre RO LS M. Sylvain O REN GA M. Bruno LE PIO UFLE M. O livier FRAN ÇAIS Mme Myriam CUBIZO LLES M. Frédéric MALLARD

Laboratoire SATIE UMR CNRS 8029 Laboratoire commun BioMérieux-Leti

Professeur EPFL Directrice de recherche CNRS (IPBS) Ingénieur, expert R&D bioMérieux Professeur ENS Cachan Maître de conférences ENS Cachan Docteur, chef de projet CEA Docteur, responsable R&D bioMérieux

rapporteur rapporteur examinateur directeur de thèse co-encadrant co-encadrante membre invité

ENSCachan bioMérieux/CEA





## Abstract

Extraction of pathogens from a biological sample is a key step for efficient diagnostic tests of infectious diseases. For bloodstream infections, current diagnostic methods are usually based on bacterial growth and take several days to provide valuable information. An accelerated result would have a high medical value to adjust therapeutic strategies. The aim of this study is to design a new approach for separation and concentration of microorganisms directly from a blood sample, to avoid timeconsuming growth stages. We report a method based on two different microsystems connected in series : it combines modification of conductivity and osmolarity of the sample with generic capture of microorganisms by dielectrophoresis. First we explore the impact of conductivity and osmolarity on the dielectric properties of blood cells and microorganisms. Dilution and acoustic forces are both analyzed to transfer blood cells and microorganisms to the optimized buffer. Then we demonstrate the feasibility of achieving the dielectrophoretic separation of microorganisms from blood cells in a low conductivity and low osmolarity medium inside a fluidic device. The structure of the device is optimized with numerical simulations and experiments performed on blood samples and various microorganisms (E. coli, S. epidermidis and C. albicans). The generic capture of microorganisms is validated, and we achieved a separation of 97% efficiency with E. coli, with an optimal inlet velocity around 100-200  $\mu$ m.s<sup>-1</sup>. Finally, we propose an improved microsystem to perform the sample preparation step on a larger volume (1-10mL) in a few hours, in order to fit the medical need.

Keywords : sample preparation | microfluidics | cell sorting | microorganism | blood | dielectrophoresis | acoustophoresis | lab-on-a-chip | *in vitro* diagnostic

## Résumé

Dans le domaine du diagnostic *in vitro*, l'étape d'extraction de micro-organismes à partir d'un échantillon complexe est une étape clé pour permettre l'identification du pathogène responsable d'une infection. Pour les septicémies, cette étape d'extraction est généralement précédée d'une étape de culture, ce qui conduit à une obtention des résultats au bout de plusieurs jours. Un résultat plus rapide (typiquement inférieur à 24h) permettrait d'augmenter le taux de survie des patients, et aurait ainsi une forte valeur ajoutée pour le corps médical. Le but de ces travaux est donc de développer une nouvelle méthode d'extraction et de concentration de pathogènes directement à partir d'un échantillon sanguin, sans étape de culture. Une stratégie en deux modules microfluidiques associés en série est proposée : elle repose sur la modification de la conductivité et de l'osmolarité de l'échantillon dans un premier module, puis sur la capture des micro-organismes par diélectrophorèse dans un second module. L'étude du premier module a permis de déterminer l'impact de la conductivité et de l'osmolarité du milieu sur les propriétés diélectriques des cellules. Deux voies ont ainsi été abordées, afin de diriger les cellules du sang et les micro-organismes vers un milieu de conductivité et d'osmolarité contrôlées : la dilution, et l'utilisation de forces acoustiques. L'étude du deuxième module a ensuite permis de démontrer la possibilité de capturer et concentrer des micro-organismes à partir d'un échantillon hypotonique et faiblement conducteur dans un écoulement microfluidique par diélectrophorèse. L'architecture d'un microsystème dédié a été définie grâce à un modèle numérique, puis validé expérimentalement avec des échantillons sanguins et différents micro-organismes (E. coli, C. albicans et S. epidermidis). La capture générique des micro-organismes est démontrée, et un taux de capture de 97% a été obtenu pour la séparation de E. coli, avec une vitesse moyenne de l'échantillon dans le microsystème de 100 à 200µm.s<sup>-1</sup>. Enfin, des perspectives d'amélioration sont présentées pour permettre d'effectuer cette étape de séparation sur un gros volume d'échantillon (1 à 10mL) en quelques heures, afin de répondre aux exigences imposées par l'urgence des tests de diagnostic des septicémies.

Mots clés : préparation d'échantillon | microfluidique | tri cellulaire | micro-organisme | échantillon sanguin | diélectrophorèse | acoustophorèse | laboratoire sur puce | diagnostic *in vitro* 

# Table des matières

A	Abstract					
R	Résumé v					
Ta	Table des matières vi					
Li	ste d	es sym	boles	xiv		
In	trod	uction		1		
Ι	Co	ntexte		3		
1	Ľin	térêt d	u diagnostic des maladies infectieuses	5		
	1.1	Impa	ct des maladies infectieuses	5		
		1.1.1	Etat des lieux	5		
		1.1.2	Agents infectieux	6		
		1.1.3	Lutte contre les maladies infectieuses : grandeur et décadence des thérapies	10		
			1.1.3.1 Nouvelles maladies infectieuses et propagation rapide	10		
			1.1.3.2 Emergence de pathogènes résistants	11		
			1.1.3.3 Découverte de pathogènes oncogènes	12		
	1.2	Focus	s sur les infections du sang	13		
		1.2.1	Avant-propos	13		
		1.2.2	Conséquences des septicémies	16		
	1.3	Objec	ctifs du diagnostic des maladies infectieuses	16		
		1.3.1	Intérêt des tests de diagnostic in vitro	16		
		1.3.2	Septicémie : cahier des charges des tests de détection	17		
2	Dia	gnosti	cs des infections du sang	19		
	2.1	Méth	odes actuelles	19		
		2.1.1	Stratégie générale	19		
		2.1.2	Amplification et détection de la charge bactérienne	19		
			2.1.2.1 Amplification : l'hémoculture	19		
			2.1.2.2 Détection : les automates	20		
		2.1.3	Coloration de Gram et examen microscopique	21		

		2.1.4 Isolement	22
		2.1.5 Identification phénotypique	22
	2.1.6 Antibiogramme		23
		2.1.7 Inconvénients de ce déroulement standard	23
		2.1.8 Bilan	25
	2.2	Nouvelles méthodes d'identification	25
		2.2.1 Identification moléculaire	25
		2.2.1.1 Introduction	25
		2.2.1.2 Les différents tests moléculaires	26
		2.2.1.3 Limitations	27
		2.2.2 Identification chimiométrique	29
		2.2.2.1 Spectrométrie de masse	29
		2.2.2.2 Spectroscopie optique	30
		2.2.2.3 Limitations	31
	2.3	Conclusion : un vrai besoin pour de nouvelles méthodes de préparation d'échantillon	31
Π	Mi	crosystèmes pour le tri cellulaire	35
3	État	de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques	37
	3.1	Le domaine du tri et de l'extraction de particules biologiques	37
		3.1.1 Tests d'extraction de cellules particulières dans le sang	37
		3.1.2 Méthodes classiques d'extraction	38
	3.2	Essor de la microfluidique	40
		3.2.1 Intérêt : intégration	40
		3.2.2 Microfluidique pour le diagnostic <i>in vitro</i>	41
	3.3	La mécanique des fluides dans les systèmes miniaturisés	43
		3.3.1 Régime laminaire	43
		3.3.2 Action d'une force extérieure	45
		3.3.3 Profil parabolique	45
		3.3.4 Bilan	46
	3.4	Méthodes passives	47
		3.4.1 Tri en fonction de la présence d'antigènes	47
		3.4.2 Tri en fonction de la taille	48
	3.5	Méthodes actives	49
		3.5.1 Stratégie	49
		3.5.2 Forces optiques	51
		3.5.3 Forces magnétiques	51
		3.5.4 Forces electriques	52
		3.5.5 Forces acoustiques	55
	0.0	3.5.6 Bilan	57
	3.6	Conclusion : vers l'utilisation de l'acoustophorése et de la diélectrophorèse	58

4	Exp	érienc	es préliminaires	61
	4.1	DEP a	avec un mélange de globules rouges et de levures <i>C. albicans</i>	61
		4.1.1	But et mise en place de l'expérience	61
		4.1.2	Description et interprétation de l'expérience	61
	4.2	Straté	gie en 2 modules	63
II	I M	odule	d'échange de milieu : modification du facteur de Clausius-Mossoti	65
5	Cha	nger le	e milieu pour modifier le comportement diélectrophorétique des cellules	67
	5.1	Influe	ence de la conductivité du milieu sur $\operatorname{Re}[f_{CM}]$	67
		5.1.1	Modélisation d'une cellule sanguine : sphère monocouche	68
		5.1.2	Modélisation d'une levure : sphère double-couche	70
		5.1.3	Modélisation d'une bactérie : ellipsoïde double-couche	71
		5.1.4	Bilan	72
	5.2	Influe	ence de l'osmolarité du milieu sur une cellule	74
		5.2.1	Généralités	74
		5.2.2	Observations expérimentales	75
			5.2.2.1 Effet du choc osmotique sur les globules rouges	75
			5.2.2.2 Effet du choc osmotique sur les globules blancs	76
			5.2.2.3 Effet du choc osmotique sur les micro-organismes	77
		5.2.3	Bilan	80
	5.3	Carac	térisation des propriétés diélectriques des cellules par électro-rotation	80
		5.3.1	Caractérisation théorique	80
			5.3.1.1 Etat de l'art et démarche scientifique	80
			5.3.1.2 Influence des paramètres de la cellule	83
			5.3.1.3 Conclusion	85
		5.3.2	Caracterisation experimentale	85
			5.3.2.1 Preparation des échantilions	85
			5.3.2.2 Description du banc experimental	80
			5.3.2.5 Chiefe d'acceptabilité	07 00
			5.3.2.4 Obtermination des paramètres	00
	<b>5</b> 4	Dilon	5.5.2.5 Determination des parametres	91
	5.4	5 4 1	Détermination des propriétés optimales	94 04
		54.1	Obtantion des propriétés optimales	94 06
		5.4.2		90
6	Opt	imisat	ion du module d'échange de milieu : l'acoustophorèse	97
	6.1	Rappe	els théoriques	97
		6.1.1	Principe général	97
		6.1.2	Intégration de cette étape à notre protocole	98
	6.2	Mise	en place du banc expérimental	99
		6.2.1	Génération d'une onde acoustique	99

		6.2.2	Obtention d'une onde acoustique stationnaire	99
		6.2.3	Choix du matériau	101
	6.2.4 Conception des puces			102
	6.2.5 Fabrication des puces			102
	6.2.6 Montage pour assurer la transmission des ondes acoustiques			103
		6.2.7	Description du banc expérimental	106
	6.3	Expér	iences préliminaires : performances du microsystème pour la manipulation de	
		billes	et de cellules par forces acoustiques	106
		6.3.1	Essais sur particules modèles	106
			6.3.1.1 But des premières expériences	106
			6.3.1.2 Paramètres expérimentaux et résultats	107
			6.3.1.3 Conclusions	109
		6.3.2	Essais sur du sang complet et sur des bactéries <i>E. coli</i>	110
	6.4	Concl	usion et perspectives	110
<b>R</b> 7	Л	ملييام	de DED, ontimication du tri collulaire	119
1 V	IVI	ouule	ue DEF . optimisation du tri centilare	115
7	Сар	ture de	e cellules sanguines et de micro-organismes par DEP sans flux	115
	7.1	Rappe	els théoriques	115
		7.1.1	Interaction champ-cellule	115
		7.1.2	DEP+, DEP- et électrophorèse	116
	7.2	Modè	le numérique et résolution par éléments finis	118
		7.2.1	Géométrie et conditions aux limites	119
		7.2.2	Répartition du champ électrique et force de DEP	120
		7.2.3	Positions d'équilibre DEP+/DEP-	123
	7.3	Valida	ation experimentale des zones de capture DEP+/DEP	123
		7.3.1		123
			7.3.1.1 Description des microsystemes	124
		7 0 0	7.3.1.2       Description du banc experimental         Maniaulation et contour de Englis	125
		7.3.2	Manipulation et capture de <i>E. coli</i>	125
		7.3.3	Séparation des différentes populations collulaires	120
		7.3.4	7.2.4.1 Dréparation des échaptillons	120
			7.3.4.1 Preparation des échantinons	121
	74	Bilan		131
	7.4	7 4 1		133
		7.4.1		133
	75	Concl		135
	7.5	COLL		100
8	Opt	imisati	ion du microsystème de capture par diélectrophorèse	137
	8.1	Influe	ence de la couche de passivation	137
		8.1.1	Etude en utilisant un modèle analytique	138

		8.1.2 Etude en utilisant un modèle numérique	140		
		8.1.3 Comparaison des résultats des modèles analytique et numérique	143		
	8.1.4 Conclusion				
	8.2	Optimisation de la hauteur du microsystème	143		
		8.2.1 Simulation numérique	143		
		8.2.2 Lois d'échelle	144		
		8.2.3 Bilan	145		
	8.3	Fabrication de microsystèmes avec différents réseaux d'électrodes	145		
		8.3.1 Architecture des microsystèmes	145		
		8.3.2 Fabrication	146		
	8.4	Influence de la structure du réseau d'électrodes interdigitées sur la force de DEP	147		
		8.4.1 Influence de la largeur du gap	148		
		8.4.1.1 Etude numérique	148		
		8.4.1.2 Etude expérimentale	148		
		8.4.1.3 Conséquence sur la viabilité des micro-organismes	150		
		8.4.2 Influence de la largeur des électrodes	151		
	8.5	Conclusion	152		
9	Rés	sultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système	2		
	opti	imisé	153		
	9.1	Influence du flux	153		
	9.2	Choix de la fréquence pour effectuer une capture générique des micro-organismes	155		
		9.2.1 Comportement diélectrophorétique des différents types cellulaires	155		
		9.2.2 Comparaison entre les simulations et les valeurs expérimentales	156		
		9.2.3 Validation expérimentale	157		
	9.3	3 Extraction des micro-organismes dans un échantillon sanguin			
		9.3.1 Préparation des échantillons	158		
		9.3.2 Description du banc expérimental	159		
		9.3.3 Résultats qualitatifs d'extraction	160		
		9.3.4 Résultats quantitatifs de capture	162		
		9.3.5 Résultats quantitatifs de relargage	163		
	9.4	Viabilité	163		
		9.4.1 Facteurs altérant la viabilité des micro-organismes	163		
		9.4.1.1 Influence de la température	164		
		9.4.1.2 Influence du champ électrique	165		
		9.4.2 Résultats expérimentaux	167		
	9.5	Bilan et conclusion	169		
V	Co	nclusions at norspectives	171		
v	UU.	neusions et perspectives	111		
10	10 Conclusion 173				

11	Pers	spectives	177
	11.1	Etudes complémentaires	177
	11.2	Propositions pour améliorer le débit	177
		11.2.1 Largeur du canal et des électrodes	178
		11.2.2 Hauteur du canal	178
		11.2.3 Parallélisation	178
	11.3	Nouvelle architecture : vers l'intégration dans un consommable microfluidique	178
Bi	iblio	graphie	192
Aı	nnex	es	193
A	Мос	dèles biologiques	193
Aı	nnex	es	193
	A.1	Billes	193
	A.2	Sang humain	193
		A.2.1 Globules rouges	194
		A.2.2 Globules blancs	194
		A.2.3 Plaquettes	194
	A.3	Micro-organismes	194
		A.3.1 Modèle biologique	194
		A.3.2 Conservation	195
		A.3.3 Culture	195
		A.3.4 Préparation des échantillons	195
		A.3.5 Utilisation de bactéries fluorescentes	196
		A.3.6 Protocole de transformation	196
		A.3.6.1 Culture et conservation	196
B	Mét	hodes de caractérisation des échantillons biologiques	197
	B.1	Dénombrement par comptage sur boîte	197
	B.2	Dénombrement par densité optique	197
	B.3	Marqueur de viabilité : intercalant IP / SYTO9	198
	B.4	Marqueur du noyau des globules blancs : SYTO9	198

# Liste des symboles

β	compressibilité (en Pa <sup>-1</sup> )
X	susceptibilité magnétique (sans dimension)
$\Delta \phi$	potentiel transmembranaire (en V)
$\Delta \phi_c$	potentiel transmembranaire critique (en V)
с	permittivité relative (sans dimension)
$\epsilon_0$	permittivité du vide (en F.m <sup>-1</sup> )
η	viscosité dynamique (en Pa.s <sup>-1</sup> )
λ	longueur d'onde (en m)
$\mu_0$	perméabilité du vide (en T.m.A <sup>-1</sup> )
ω	pulsation (en rad.s <sup>-1</sup> )
$\phi(eta, ho)$	facteur de contraste acoustique (sans dimension)
ρ	masse volumique (en kg.m <sup>-3</sup> )
σ	conductivité (en S.m <sup>-1</sup> )
$\underline{f}_{CM}$	facteur de Clausius-Mossoti (sans dimension)
В	champ magnétique (en T)
С	vitesse du son (en m.s <sup>-1</sup> )
D	coefficient de diffusion (en $m^2$ . $s^{-1}$ )
Ε	champ électrique (en V.m <sup>-1</sup> )
f	fréquence (en Hz)
$f_c$	fréquence de coupure (en Hz)
$G_0$	gain (sans dimension)
$Im[\underline{f}_{CM}]$	partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossoti
m	masse (en kg)
Na	constante d'Avogadro (en mol <sup>-1</sup> )

#### Table des matières

pression (en Pa)
constante universelle des gaz parfaits (en J. $m^{-1}$ . $K^{-1}$ )
rayon (en m)
nombre de Reynolds (sans dimension)
partie réelle du facteur de Clausius-Mossoti
température (en K)
potentiel électrique (en V)
vitesse (en m.s <sup>-1</sup> )
acide désoxyribonucléique
acide ribonucléique
Clausius-Mossoti
cellule tumorale circulante
diélectrophorèse
diélectrophorèse positive
diélectrophorèse négative
déplacement latéral déterministe
deep reactive ion etching
electrospray ionisation mass spectroscopy
globule blanc
globule rouge
matrix-assisted laser desorption/ionisation - time of flight
polymerase chain reaction
potentiel transmembranaire
unité formant colonie

## Introduction

Les maladies infectieuses sont - encore aujourd'hui - responsables de près de 7 millions de morts chaque année. Ce chiffre est en faible diminution, mais l'émergence de nouvelles maladies infectieuses, comme le VIH, ou la forte progression de maladies existantes, comme la dengue, sont des phénomènes particulièrement inquiétants. Pour tenter d'enrayer ce phénomène, le développement de tests de diagnostic efficaces et rapides est essentiel, afin de contrôler la progression des maladies, d'empêcher leur transmission et d'améliorer le traitement des patients. Le diagnostic nécessite généralement une extraction des pathogène responsables de l'infection afin de les identifier et de mettre en place un traitement adapté. Cette étape est particulièrement problématique lorsque les pathogènes sont présents en très faible quantité dans l'échantillon, comme c'est le cas pour les infections du sang.

Les travaux présentés dans ce manuscrit décrivent le développement et la conception d'un nouveau système microfluidique permettant la capture de micro-organismes dans un échantillon sanguin afin d'accélérer le diagnostic des septicémies.

La partie I présente le contexte général de ces travaux : elle détaille l'importance du diagnostic pour les maladies infectieuses puis plus particulièrement pour les infections du sang et dresse un bilan critique des méthodes existantes pour le diagnostic des septicémies. L'état de l'art met en évidence une étape limitante des systèmes de diagnostic actuels, qui réside dans l'extraction des micro-organismes à partir d'un échantillon de sang prélevé sur le patient. La partie II propose une analyse des nouvelles approches qu'offre la microfluidique pour la capture et la séparation de cellules. Cette revue du savoir-faire dans le domaine permet de dégager une stratégie innovante pour l'extraction de micro-organismes à partir d'un échantillon sanguin. Nous proposons d'effectuer cette opération en associant deux modules microfluidiques en série. Le premier module, développé dans la partie III, a pour but de changer les propriétés du milieu de suspension des cellules (conductivité et osmolarité) pour modifier sélectivement les propriétés diélectriques des cellules sanguines. Cela permet d'utiliser des forces de diélectrophorèse (DEP) pour effectuer un tri binaire entre les cellules sanguines perméabilisées et les micro-organismes. Cette fonction de séparation et concentration de micro-organismes par l'utilisation de forces de DEP est développée dans un second module, décrit dans la partie IV. Enfin la partie V présente les perspectives d'amélioration pour optimiser les performances globales de cette nouvelle méthode d'extraction de pathogènes à partir d'un échantillon complexe.

## Contexte

## **Partie I**

Le chapitre 1 dresse un bilan des maladies infectieuses et de l'importance des tests de diagnostic in vitro avec un interêt particulier pour les infections du sang. Les différentes étapes de détection, d'identification et de détermination de la sensibilité aux antibiotiques pour le diagnostic des infections du sang sont détaillées dans le chapitre 2. Ce chapitre présente les méthodes standards et les nouvelles méthodes en plein essor, et démontre la nécessité de développer une nouvelle méthode d'extraction de pathogènes à partir d'un échantillon sanguin.

# 1 L'intérêt du diagnostic des maladies infectieuses

#### 1.1 Impact des maladies infectieuses

#### 1.1.1 Etat des lieux

Les maladies infectieuses sont depuis toujours une grande menace pour la population, et sont restées pendant longtemps la première cause de mortalité dans le monde.

Elles continuent chaque année à tuer près de 7 millions de personnes dans le monde (figure 1.1), et sévissent principalement dans les pays en voie de développement, où elles sont encore responsables de près de 35% des décès (figure 1.2).



FIGURE 1.1 – Les maladies infectieuses les plus meurtrières en 2011<sup>1</sup>.

Les maladies infectieuses tuent cependant de moins en moins de personnes dans le monde : la mise en place de mesures d'hygiène efficaces (Semmelweiss en 1847), la découverte du principe de la vaccination (Edwaerd Jenner en 1796) et l'utilisation des antibiotiques (Alexandre Flemming en 1928) ont permis de lutter efficacement contre les maladies infectieuses. La variole a ainsi pu être éradiquée

<sup>1.</sup> source : Organisation Mondiale de la Santé (http://www.who.int)



FIGURE 1.2 – Pourcentage des décès imputables aux maladies infectieuses en 2011 dans le monde  $^2$ .

en 1980 suite à un vaste programme mondial de vaccination soutenu par l'Organisation Mondiale de la Santé. C'est cependant l'une des seules maladies infectieuses à avoir disparu. Des maladies comme la peste, le choléra ou la tuberculose, qui ont fait des ravages par le passé, continuent encore aujourd'hui à faire des victimes. Entre 1347 et 1352, les historiens estiment que la peste a condamné entre 30 et 50% de la population en Europe. Aujourd'hui, cette maladie n'est pas encore totalement éradiquée et continue à faire des victimes chaque année [Cabanel et al., 2013]. La tuberculose quant à elle a tué encore plus d'un million de personnes en 2011. Les maladies infectieuses sont donc encore loin de pouvoir être considérées comme une menace du passé, et continuent d'être au cœur des préoccupations des instances de santé.

#### 1.1.2 Agents infectieux

Ces infections sont dues à la pénétration dans l'organisme et au développement incontrôlé d'éléments pathogènes. Ces agents peuvent être des virus, des bactéries, des champignons, des parasites ou encore des prions (tableau 1.1).

**Virus** Les virus mesurent en moyenne 200nm. Leur constitution est relativement simple : du matériel génétique (ADN ou ARN) est entouré par une capside protéique, elle-même éventuellement entourée de membrane plasmique empruntée à leurs cellules hôtes. Au cours d'une infection, ils s'introduisent à l'intérieur d'une cellule dont ils détournent la machinerie cellulaire pour se répliquer.

<sup>2.</sup> source : Organisation Mondiale de la Santé (http://www.who.int)

type de pathogène	agent infectieux & maladie associée
virus	VIH (SIDA)
	virus de la rougeole
	virus de l'hépatite B
	influenzavirus (grippe)
	coronavirus (SARS)
	virus de la dengue
	virus Ebola
	virus de la rage
bactérie	Haemophilus influenzae (méningite)
	Mycobacterium tuberculosis (tuberculose)
	Clostridium tetani (tétanos)
	<i>Vibrio cholerae</i> (choléra)
	Yersinia pestis (peste)
champignon	Candida albicans (candidose)
	Aspergillus fumigatus (aspergillose bronchopulmonaire)
parasite	Plasmodium falciparum (paludisme)
-	Trypanosoma brucei (maladie du sommeil)
prion	encéphalophatie spongiforme bovine (maladie de Creutzfeldt Jacob)

#### Tableau 1.1 – Agents pathogènes

**Bactéries** Les bactéries (figure 1.3 A) mesurent en général entre 1 et 10µm. Ce sont des organismes unicellulaires et sans noyau (on parle d'organismes procaryotes). Elles sont capables de se répliquer de manière asexuée, par scissiparité. Le temps de division (aussi appelé temps de génération) d'une bactérie est variable selon l'espèce et les conditions de culture (tableau 1.2).

Tableau 1.2 – Temps de génération de quelques bactéries.

Espèce	temps de génération in vitro
Escherichia coli	20 minutes
Staphylococcus aureus	40 minutes
Mycobacterium tuberculosis	20 heures

Leur génome est constitué d'un unique chromosome circulaire. Le cytoplasme peut aussi contenir des plasmides, qui sont des molécules d'ADN circulaires extra-chromosomiques que les bactéries peuvent s'échanger rapidement. Ils peuvent coder pour des toxines ou des enzymes ayant un rôle dans certains mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Les bactéries peuvent être de différentes formes (figure 1.4), mais on trouve principalement des coques et des bacilles. C'est la présence d'une paroi externe rigide autour de l'organisme unicellulaire qui définit sa taille et sa forme. Elle sert aussi de barrière protectrice contre l'environnement extérieur, et permet notamment aux bactéries de résister au choc osmotique.

On distingue deux grands groupes de bactéries en fonction de la composition de leur paroi (figure 1.3 B). Les bactéries Gram+ ont une paroi composée de 2 éléments principaux : une paroi épaisse de peptidoglycane et une membrane plasmique. Les Gram- possèdent également une membrane plasmique, mais une couche de peptidoglycane moins épaisse entourée par une membrane externe. Ces différences de morphologie peuvent être mises en évidence en laboratoire par le test de coloration de Gram [Bartholomew and Mittwer, 1952].



FIGURE 1.3 – (A) schéma d'une bactérie  $^{3}$  et (B) structure des parois bactériennes Gram + et Gram -  $^{4}$ .



FIGURE 1.4 – Les différentes formes des bactéries<sup>5</sup>.

On distingue aussi trois catégories de bactéries en fonction de leur besoin en oxygène pour se développer : les bactéries aérobies strictes nécessitent la présence d'oxygène pour se diviser, les bactéries anaérobies strictes ne peuvent se développer qu'en l'absence d'oxygène, et les bactéries aéro-anaérobies facultatives se développent quelle que soit la concentration en oxygène de l'air. Ces

<sup>3.</sup> source : d'après http://163.16.28.248/bio/activelearner/23/ch23c3.html

<sup>4.</sup> source : d'après http ://www.studyblue.com/notes/note/n/microbiology-ch-4-/deck/5128717

<sup>5.</sup> source : http://www.ppdictionary.com/gnbac.html

propriétés sont particulièrement importantes lorsque l'on souhaite mettre en culture les bactéries en laboratoire, puisqu'il faut adapter le type de culture en fonction de la bactérie.

**Champignons** Contrairement aux bactéries, les champignons possèdent un noyau qui renferme le matériel génétique (on parle d'organisme eucaryote). Ils peuvent être pluricellulaires (comme les moisissures) ou unicellulaires (comme les levures, qui mesurent en général entre 6 à 10µm). Les levures possèdent aussi une membrane plasmique entourée par une paroi externe.

**Parasites** Ce sont des êtres vivants intra ou extracellulaires, qui possèdent une ou plusieurs cellules. Un parasite vit aux dépends de l'hôte qui l'héberge, et peut parfois mettre sa vie en danger. Ils sont en général transmis par l'alimentation ou par des vecteurs tels que les moustiques.

**Prions** Le prion est un agent pathogène qui n'a été découvert que récemment, il y a environ 30 ans. Il ne contient pas de matériel génétique, et est uniquement de nature protéique.

**Micro-organismes non-pathogènes** Tous les micro-organismes présents dans le corps humain ne sont pas responsables de maladies. Leur très grande majorité est même particulièrement utile pour le bon fonctionnement du corps humain, comme la flore intestinale. On estime que le corps humain renferme 10 fois plus de bactéries que de cellules humaines [Berg, 1996], que l'on trouve en majorité dans le système digestif (figure 1.5), et dont on commence à peine à saisir la complexité et le rôle majeur dans la santé humaine [Larsen et al., 2010] [DiBaise et al., 2008].



FIGURE 1.5 – Nombre moyen de grands groupes de bactéries (on parle de phyla) chez l'Homme [Dethlefsen et al., 2007].

#### 1.1.3 Lutte contre les maladies infectieuses : grandeur et décadence des thérapies

Si les maladies infectieuses ont eu un impact majeur sur l'évolution de la population mondiale dans les siècles passés (en décimant parfois des populations entières sur des périodes très courtes comme pour les grandes épidémies de peste), la médecine de la fin du XIXème siècle a fait émerger des stratégies de lutte extrêmement efficaces qui ont réduit cet impact de façon considérable, au point que certaines infections ont quasiment complètement disparu. Cependant, non seulement cette éradication n'est pas totale, mais les moyens de lutte s'épuisent face à une évolution accélérée des agents pathogènes et de leurs modes de propagation.

#### 1.1.3.1 Nouvelles maladies infectieuses et propagation rapide

L'émergence et la propagation de nouvelles maladies infectieuses, telles que la dengue, le VIH, la famille des coronavirus ou encore la grippe aviaire sont plus que jamais préoccupantes pour l'avenir de la population.

De plus en plus de facteurs favorisent l'apparition et la diffusion de ces maladies. La promiscuité entre les habitats des hommes et des animaux, dont les territoires sont modifiés par les déforestations massives et la croissance démographique, favorise la transmission de maladies entre l'animal et l'homme (on parle de zoonose). La grippe aviaire en est un exemple récent.

Le tourisme et l'explosion du trafic aérien, ainsi les changements climatiques modifient la dynamique de propagation des infections, et rendent plus difficile le confinement d'un pathogène à un territoire donné. La dengue est un exemple frappant de cette nouvelle dissémination (figure 1.6) : le nombre de cas déclarés a explosé en 50 ans, passant de moins de 20 000 cas dans les années 1960 à près d'un million de personnes contaminées dans les années 2000. Les pays touchés par cette maladie sont pratiquement 10 fois plus nombreux qu'il y a 50 ans.



 $\rm FIGURE\,1.6-Augmentation\,du\,nombre\,de\,cas\,de\,dengue\,dans\,le\,monde\,et\,multiplication\,du\,nombre\,de\,pays\,concernés\,depuis\,1955.^{\,6}$ 

<sup>6.</sup> source : Organisation mondiale de la Santé (www.who.int)

#### 1.1.3.2 Emergence de pathogènes résistants

Le nombre de décès à cause des maladies infectieuses a considérablement diminué pendant le siècle dernier, notamment grâce à l'utilisation des antibiotiques. Cependant l'utilisation massive des antibiotiques est au cœur des préoccupations des instances de santé, car cet usage favorise l'émergence de pathogènes résistants [de Sande-Bruinsma et al., 2008]. C'est une course de vitesse permanente entre l'adaptabilité sans commune mesure des micro-organismes et la découverte de nouveaux moyens pour lutter contre ces pathogènes.

En effet, les pathogènes s'adaptent de plus en plus vite aux nouveaux antibiotiques (figure 1.7). Couplée au temps de génération très court des agents, la pression de sélection imposée par l'utilisation massive d'antibiotiques favorise à la fois la sélection des souches pathogènes les plus résistantes et l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance. En outre, les agents bactériens peuvent transmettre l'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance entre différentes espèces par conjugaison, un mécanisme de transfert qui leur permet d'échanger des plasmides porteurs de gènes de résistance [Cohen et al., 1972]. Ce mécanisme accélère la diffusion des mécanismes de résistances entre les espèces. La situation est d'autant plus préoccupante que le nombre de nouvelles molécules antibiotiques mises sur le marché diminue chaque année (figure 1.8).



FIGURE 1.7 – Années où l'émergence de résistance a été rapportée suite à la mise sur le marché de différentes classes d'antibiotiques [Pray, 2008].



FIGURE 1.8 – Evolution du nombre d'autorisations de mise sur le marché de nouvelles molécules antibiotiques entre 1983 et 2012 aux Etats-Unis [Boucher et al., 2013] [Spellberg et al., 2004].

L'émergence de ces nouveaux pathogènes résistants (comme certaines souches résistantes à la méticilline dans l'espèce *Staphylococcus aureus*) est donc un véritable problème de santé publique, mais devient aussi un problème économique, puisque les soins associés à ces pathogènes nécessitent généralement une hospitalisation plus longue et des médicaments plus coûteux. Le surcoût associé aux infections de pathogènes résistants était estimé à 5 milliards de dollars pour les Etats-Unis en 2004 [IDSA, 2004], et à plus d'un milliard d'euros pour l'Europe en 2007 [ECDPC, 2009].

Le problème de l'émergence de mécanismes de résistance chez les pathogènes n'est malheureusement pas réduit au monde bactérien. Les virus peuvent aussi s'adapter : le VIH est maintenant capable de devenir résistant aux molécules thérapeutiques, comme l'azidothymidine (AZT), l'un des constituant des trithérapies [Tu et al., 2010]. Le paludisme est lui aussi concerné par l'émergence de résistance : un des parasites à l'origine de la maladie, *Plasmodium falciparum*, est devenu résistant aux précédentes générations de médicaments comme la chloroquine.

#### 1.1.3.3 Découverte de pathogènes oncogènes

La communauté scientifique s'intéresse aussi à nouveau aux maladies infectieuses à cause de l'existence d'une relation entre virus ou bactéries et cancers [Huebner and Todaro, 1969]. La mise en évidence d'un lien entre l'apparition d'un cancer et les papillomavirus [Bosch et al., 2002] a permis de mettre au point un nouveau vaccin dont le but est de réduire le nombre de cancers du col de l'utérus. Les scientifiques portent donc une attention toute particulière à ces maladies infectieuses qui peuvent avoir de fortes répercutions en oncologie.

L'infection chronique de l'estomac par la bactérie *Helicobacter pilori* est également connue pour être une cause majeure de cancer de l'estomac [Blaser et al., 1995]. Des méthodes de détection de cette bactérie ont été mises en place pour caractériser les cas d'infections dès que l'infection devient symptomatique, avec un impact certain sur l'efficacité et la pertinence des traitements et l'occurrence des cancers. L'un des enjeux actuels est d'amener ces tests à un niveau de simplicité et de coûts suffisant pour mettre en place des campagnes de dépistage sur les patients asymptomatiques.

#### 1.2 Focus sur les infections du sang

#### 1.2.1 Avant-propos

Le sang (figure 1.9) est habituellement un milieu stérile, dans lequel on retrouve des populations cellulaires ayant de grandes disparités en taille et en concentration (tableau 1.3). On compte en général un globule blanc (GB) pour 650 globules rouges (GR), et une plaquette pour 20 globules rouges.



FIGURE 1.9 – Illustrations de cellules sanguines observées au microscope optique entre lame et lamelle (A) et au microscope électronique à balayage <sup>7</sup>(B).

Il arrive régulièrement que le sang circulant soit contaminé par des bactéries (par exemple à la suite d'une blessure, mais également à cause d'une certaine perméabilité des parois de l'intestin dans certaines conditions). Chez des personnes en bonne santé, de tels évènements sont parfaitement maîtrisés par le système immunitaire et restent asymptomatiques. Lorsque ce n'est pas le cas (patients immunodéprimés par exemple) et que les bactéries se retrouvent en quantité importante dans le sang,

Tableau 1.3 - Principales caractéristiques des cellules du sang.

type	e cellulaire	forme	taille	concentration dans le sang
thrombocyte	(plaquette)	forme irrégulière	3 µm	1,5-4,5 10 <sup>8</sup> / mL
leucocyte	(globule blanc)	généralement sphérique	5-20 µm	5-7 10 <sup>6</sup> /mL
érythrocyte	(globule rouge)	disque biconcave	Ø = 8 µm	4-6 10 <sup>9</sup> /mL

7. source: http://fr.wikipedia.org/wiki/Sang

on parle de septicémie. Ce cas est souvent associé à un emballement de la réponse inflammatoire, avec des complications pouvant entrainer le dysfonctionnement de plusieurs organes vitaux et parfois le décès du patient [Cohen, 2002]. Le taux de mortalité se situe autour de 20% [Martin et al., 2003].

Dans la majorité des cas, le pathogène provient d'un foyer infectieux déjà existant chez le patient, comme une infection des poumons, de la cavité abdominale ou du système urinaire [Vincent et al., 2006], mais l'infection peut aussi provenir par exemple de la mise en place de cathéters en milieu hospitalier. Le tableau 1.4 récapitule les principaux foyers infectieux ainsi que les pathogènes associés.

Site infectieux	Micro-organismes		
Peau	Staphylocoque Streptocoque		
Tube digestif	Entérobactéries Entérocoque Streptocoque D Anaérobies		
Voies biliaires	Entérobactéries Entérocoque Streptocoque D Anaérobies		
Poumon	Pneumocoque Klebsiella pneumoniae Legionella pneumophila		
Endocarde	Streptocoque Entérocoque Staphylocoque		
Voies urinaires	Entérobactéries Entérocoque <i>Pseudomonas</i>		
Voies vasculaires	Staphylocoque BNG		

Tableau 1.4 - Nature du pathogène selon le foyer infectieux

Environ 50% des pathogènes à l'origine d'infection du sang sont des bactéries Gram+, 40% des bactéries Gram-, 5% des champignons et 5% des infections sont polymicrobiennes [Martin et al., 2003]. D'après une étude plus récente en Europe [Vincent et al., 2006], le pourcentage d'infections causées par des champignons est plus élevé, autour de 17%.

Le syndrome septique se caractérise avant tout par la violence de la réponse inflammatoire et par la rapidité de la dégradation de l'état de santé du patient. La mort peut survenir en à peine quelques heures. Les symptômes d'un syndrome septique ne sont à la fois ni évidents, ni très caractéristiques. Dans le vocabulaire clinique, un état de sepsis correspond à l'apparition, en plus d'une infection, d'au moins 2 des critères suivants : une température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à

36°C, un rythme cardiaque supérieur à 90 battements/min, une fréquence respiratoire supérieure à 20 respirations/minute, une concentration sanguine en globules blancs supérieure à 12 000/mm<sup>3</sup> ou inférieure à 4 000/mm<sup>3</sup>, ou la présence dans le sang de plus de 10 % de neutrophiles immatures [Bone et al., 1992]. Il a été montré qu'un élément crucial pour la survie des patients est la suppression de l'origine de la septicémie par l'application d'un traitement antibiotique adapté. La durée qui s'écoule entre la détection du sepsis (par ces critères cliniques) et la mise en place d'un traitement antibiotique ciblé joue un rôle critique sur le taux de survie des patients (figure 1.10), avec une décroissance quasi linéaire de 80% à moins de 30% dans les 8 premières heures, pour chuter à quelques % au bout de 36 heures.



FIGURE 1.10 – Taux de survie des patients en fonction du nombre d'heures écoulées entre les premiers signes du sepsis (ici une hypotension) et l'administration du traitement antibiotique [Kumar et al., 2006].

Devant l'urgence de la situation, les cliniciens procèdent souvent à un diagnostic en fonction de la localisation du foyer d'infection (tableau 1.4), ou de la présence ou non d'un cathéter : cela les renseigne sur l'identité la plus probable de l'agent infectieux et leur permet d'affiner la décision thérapeutique en fonction de leur connaissance de l'épidémiologie locale.

La décision thérapeutique des médecins est donc principalement probabiliste et le taux d'échecs thérapeutiques, dont les conséquences dans les cas de septicémies sont gravissimes, reste relativement élevé. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, le corps médical a très peu d'outils de diagnostic qui lui permettrait de prendre rapidement la meilleure décision thérapeutique.

#### 1.2.2 Conséquences des septicémies

Avec près de 1.2 millions de cas chaque année en Europe [Goto and Al-Hasan, 2013], la septicémie reste un des premiers enjeux de la santé publique. Les infections du sang ont été recensées comme étant la 11ème cause de décès aux Etats-Unis en 2011 [Hoyert and Xu, 2012]. Le nombre de patients hospitalisés avec une infection du sang est en constante hausse (figure 1.11 A) depuis une décennie, et les dépenses hospitalières pour leur prise en charge ont triplé en 10 ans (figure 1.11 B).

Le taux élevé de mortalité, la multiplication des cas et la hausse des couts de prise en charges justifient l'intérêt porté à cette maladie.



FIGURE 1.11 – Augmentation (A) du nombre de cas de septicémies ou sepsis [Hall et al., 2011] et (B) des dépenses hospitalières associées [HCUP, 2009] aux Etats-Unis sur la dernière décennie.

#### 1.3 Objectifs du diagnostic des maladies infectieuses

#### 1.3.1 Intérêt des tests de diagnostic in vitro

Afin de soigner au mieux les patients victimes de maladies infectieuses, les tests de diagnostic *in vitro* visent à détecter la présence d'un pathogène à partir d'un échantillon et à l'identifier.

**Détection précoce pour éviter la propagation** De façon générale, la première fonction du diagnostic *in vitro* est de pouvoir détecter au plus vite la maladie, pour empêcher sa transmission et sa propagation en prenant des mesures sanitaires adaptées. Cet aspect est essentiel en particulier pour les maladies transitoirement asymptomatiques, comme le VIH ou la syphilis. Dans ce cas, la détection des porteurs contagieux permet de limiter la transmission de la maladie.

**Identification pour un traitement adapté** La seconde fonction du diagnostic est de guider le choix de la thérapie par un médecin. Pour cela, les méthodes de diagnostic doivent parvenir à identifier au plus vite le pathogène à l'origine de la maladie et guider le choix du ou des antibiotiques à administrer. Ces aspects sont particulièrement cruciaux pour des maladies dont les symptômes ne sont pas spécifiques, comme les fortes fièvres par exemple.

**Utilisation raisonnée des antibiotiques** A l'heure où le phénomène de résistance aux antibiotiques s'accélère et que le développement de nouveaux agents anti-infectieux diminue, il devient primordial d'utiliser les antibiotiques de manière judicieuse et à bon escient. Connaître l'identité d'un pathogène à l'origine d'une maladie permet de maîtriser l'usage des antibiotiques. En particulier, cela permet d'éviter l'utilisation inutile d'antibiotique pour une infection virale (dans le cas d'une angine par exemple), mais aussi de réduire l'utilisation prolongée d'antibiotiques à large spectre en utilisant des antibiotiques plus ciblés selon le type du pathogène identifié.

#### 1.3.2 Septicémie : cahier des charges des tests de détection

Dans le cas de la septicémie, le choix de la thérapie a une importance vitale. Comme les signes cliniques ne sont pas spécifiques, il est d'autant plus important, pour cibler au mieux le traitement, de déterminer la nature et les caractéristiques de l'agent pathogène. Il s'agit, le plus rapidement possible, de confirmer la présence d'un pathogène, de permettre son identification, et déterminer son profil de sensibilité aux antibiotiques.

20 à 30% des patients ne reçoivent toujours pas une thérapie antibiotique adaptée contre l'agent infectieux [Harbarth et al., 2003] [Leibovici et al., 1998], ce qui diminue leur chance de survie : l'amélioration des tests de diagnosctics *in vitro* est donc primordiale. En outre, un meilleur diagnostic permettrait de réduire le coût de la prise en charge hospitalière d'une septicémie (estimé à 22 100 \$ par cas en 2001 aux Etats-Unis [Angus et al., 2001]), en réduisant le temps d'hospitalisation, et à plus long terme en limitant l'émergence de pathogènes résistants.

Pour qu'un test soit efficace pour le diagnostic d'une septicémie, il doit répondre à trois critères essentiels : il doit être rapide, sensible, et générique.

**Rapidité** La rapidité d'administration d'une antibiothérapie est un facteur crucial pour les chances de survie du patient. En pratique, l'état du patient s'altère à une rapidité telle que le médecin

#### Chapitre 1. L'intérêt du diagnostic des maladies infectieuses

n'est pas prêt à attendre les résultats d'un quelconque test. L'antibiothérapie est donc administrée immédiatement. Le résultat des tests de détection/identification/résistance aux antibiotiques peut servir à réorienter la thérapie en restreignant le spectre des antibiotiques utilisés et en adaptant les doses administrées. En pratique, si l'on considère la méthode classique de diagnostic basée sur la croissance bactérienne (détaillée dans le prochain chapitre), le résultat du test arrive au mieux au bout de quelques jours et est rarement utilisé pour réorienter une quelconque décision thérapeutique sur le patient concerné. En revanche, fournir les informations de diagnostic plus tôt, et en particulier au moment où les cliniciens souhaitent orienter ou réorienter leur décision, apporterait une valeur médicale très importante à ce type de tests.

**Sensibilité** Une grande difficulté du diagnostic des infections du sang vient de la très faible quantité de pathogènes dans le sang : la concentration des micro-organismes est généralement inférieure à 10 ufc<sup>8</sup> /mL, et n'excède pas 1 ufc/mL chez 50% des patients adultes [Lamy, 2005]. Le test doit permettre de détecter la présence d'un pathogène parmi plus de cinq milliards de globules rouges. Quelle que soit la méthode de détection du pathogène, elle doit donc être extrêmement sensible.

**Généricité** De très nombreuses familles de micro-organismes peuvent être à l'origine des infections du sang. Il faut donc que le test soit capable de détecter indifféremment la présence de levures, de bactéries Gram- et de bactéries Gram+.

<sup>8.</sup> ufc signifie 'unité formant colonie' : c'est une unité de dénombrement qui représente le nombre de micro-organismes viables capables de former une colonie après étalement sur boîte d'agar et incubation à une température adaptée

# 2 Diagnostics des infections du sang

Ce chapitre présente le déroulement des tests d'identification et de sensibilité aux antibiotiques pour le diagnostic des infections du sang. Il détaille les étapes couramment pratiquées en laboratoire, et développe aussi les nouvelles méthodes, en particulier les tests moléculaires et les tests reposant sur la détermination de la composition chimique des micro-organismes.

#### 2.1 Méthodes actuelles

#### 2.1.1 Stratégie générale

A partir d'un prélèvement sanguin, l'échantillon est tout d'abord mis en culture pour multiplier le nombre de pathogènes et ainsi augmenter la probabilité de détection. Après culture, les pathogènes sont isolés du reste de l'échantillon, pour être identifiés par des tests biochimiques. On caractérise également leur capacité à se multiplier en présence de différentes familles et concentrations d'antibiotiques pour identifier la présence de mécanismes de résistance aux antibiotiques.



 $\ensuremath{\mathsf{FIGURE}}\xspace 2.1$  – Déroulement d'un protocole standard de diagnostic d'une infection du sang .

#### 2.1.2 Amplification et détection de la charge bactérienne

#### 2.1.2.1 Amplification : l'hémoculture

A cause de la très faible quantité de pathogènes dans le sang (la concentration excède rarement 10 ufc/mL [Lamy, 2005]), on ne peut pas envisager un examen direct des pathogènes à partir d'une

prise de sang. Il faut passer par une étape d'enrichissement de l'échantillon. Cette étape, appelée hémoculture, consiste à donner au pathogène des conditions favorables pour qu'il puisse se multiplier afin que la quantité de micro-organismes présente dans l'échantillon augmente suffisamment pour être détectable.



FIGURE 2.2 – (A) Sets d'hémocultures aérobie/anaérobie BacT/ALERT (bioMérieux) et Bactec (BD). (B) Automates BacT/ALERT® 3D (bioMérieux) et BACTEC FX (BD).

Le prélèvement de sang (entre 10 et 40mL) se fait dans un flacon adapté contenant des nutriments pour le pathogène (figure 2.2 A). Ces nutriments peuvent être spécifiques à un type de pathogène si l'on suspecte une famille particulière, comme les mycobactéries, mais sont le plus souvent génériques (et conviennent donc à tout type de pathogène). En général, deux flacons d'hémoculture sont inoculés en même temps, un en condition aérobie et un autre en condition anaérobie, afin de couvrir une gamme de conditions de croissance la plus large possible. En plus des nutriments, les flacons d'hémocultures contiennent très souvent des substances qui permettent d'inhiber l'action antibactérienne du complément <sup>1</sup> mais aussi l'action des antibiotiques lorsque le patient a déjà débuté un traitement antibiotique avant le prélèvement de l'échantillon.

#### 2.1.2.2 Détection : les automates

Les flacons d'hémoculture sont ensuite placés à une température idéale pour la multiplication des micro-organismes, en général 37 °C. La détection de la croissance d'un pathogène permet de confirmer le diagnostic infectieux : le cas échéant, on parle d'hémoculture positive.

Pour détecter au plus tôt les hémocultures positives, des automates ont été mis au point (figue 2.2 B). Ces appareils permettent de détecter une croissance bactérienne en mesurant l'augmentation de la quantité de  $CO_2$  à l'intérieur des flacons d'hémoculture. Cette étape requiert en général 24 à 72h (figure 2.3). Le temps de culture dépend du temps de génération du pathogène, et sera donc beaucoup plus long en cas d'infection par des bactéries dont les conditions de culture sont difficiles à reproduire en laboratoire (on parle d'organismes fastidieux), ou par des levures.

<sup>1.</sup> ensemble de protéines du plasma sanguin faisant partie de l'immunité innée



FIGURE 2.3 – Temps de culture nécessaire pour qu'une hémoculture soit déclarée positive pour différents types de pathogènes. [Beekmann et al., 2003].

L'hémoculture est donc une méthode qui détecte une croissance de micro-organismes dans un échantillon sanguin : ce test permet de confirmer la présence de pathogènes dans la circulation sanguine. Il est générique (même s'il repose sur l'utilisation de différentes conditions de culture), et ne permet pas directement d'identifier le pathogène à l'origine de l'infection. Des tests complémentaires sont alors réalisés à partir d'une hémoculture positive afin de déterminer l'identité du pathogène.

#### 2.1.3 Coloration de Gram et examen microscopique

Après l'obtention d'une hémoculture positive, la première analyse à être effectuée est la coloration de Gram, qui permet de visualiser l'absence ou non de membrane externe, et donc de distinguer les bactéries Gram+ des bactéries Gram-. Cette étape permet aussi d'observer la forme des micro-organismes (coques, bacilles,...), ainsi que leur agencement (micro-organismes en grappe, en chaînette ou isolés).

Les résultats de la coloration de Gram et des premières observations microscopiques constituent un premier outil pour l'identification du pathogène, et permettent d'affiner le diagnostic de façon probabiliste. Par exemple une bactérie Gram+ en grappe appartient généralement à la famille des staphylocoques : cette première information peut donc confirmer ou réorienter le traitement antibiotique. Ces résultats ne sont pas suffisants pour autant, puisqu'ils ne permettent pas de connaître l'identité précise du pathogène, et les antibiotiques administrés doivent donc toujours couvrir une large gamme de pathogènes (la famille des staphylocoques comprend par exemple les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, dont le traitement pourrait être différent).

Il faut donc ensuite isoler le pathogène afin de l'identifier formellement et de déterminer sa sensibilité aux antibiotiques.
# 2.1.4 Isolement

Une fraction de l'échantillon est donc étalée sur une boîte de milieu de culture gélosé pour obtenir, après culture, des colonies isolées. Cette étape d'isolement repose à nouveau sur la croissance des pathogènes : elle dure en général 18 à 24h pour *E. coli*, dont le temps de génération est court, mais peut s'étendre sur 3 semaines pour les mycobacteries.



FIGURE 2.4 – Milieux chromogènes pour détecter la présence de staphylocoques dorés résistants à la méthycilline. (A) *chromID MRSA* (bioMérieux) et (B) *BBL CHROMagar MRSA* (BD).

Certains milieux de culture gélosés peuvent contenir des substrats chromogènes qui permettent de révéler une activité enzymatique particulière et donner un premier niveau d'identification. Le milieu de culture peut également favoriser la croissance de certains micro-organismes, voire contenir des antibiotiques. La croissance de colonies renseigne alors sur l'identité et la présence d'un mécanisme de résistance à l'antibiotique considéré. A titre d'exemple, il existe des milieux qui permettent de détecter spécifiquement les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (figure 2.4). En effet, la distinction rapide entre les staphylocoques dorés sensibles ou résistants à la méticilline est d'une importance capitale dans le choix de l'antibiothérapie.

# 2.1.5 Identification phénotypique

L'identification complète du pathogène se fait en réalisant une série de tests biochimiques, comme le besoin en oxygène, ou la capacité à dégrader certains composés chimiques. Ce test se présente généralement sous forme de galeries comportant plusieurs puits, où chaque puits permet d'interroger un aspect particulier du métabolisme du micro-organisme. En regroupant les réponses de chacun des puits, il est alors possible d'identifier très précisément le pathogène. La figure 2.5 illustre quelquesunes des galeries commercialisées. Les résultats sont obtenus à partir d'une colonie isolée, en général après 18 à 24h.

Ce système de test en combinatoire a été automatisé dans le système *Vitek2* de bioMérieux, qui est aujourd'hui la référence dans les laboratoires de microbiologie clinique.



FIGURE 2.5 – Exemples de galeries commerciales pour l'identification phénotypique de micro-organismes : (A) galerie *API* (bioMérieux) et (B) galerie *BD crystal* (BD).

# 2.1.6 Antibiogramme

Des tests de sensibilité aux antibiotiques sont lancés en parallèle, en déposant sur la gélose un gradient de concentration d'antibiotiques et en déterminant la valeur de la concentration minimale permettant d'inhiber la croissance des pathogènes. Ces gradients de concentration peuvent être obtenus à l'aide de bandelettes ou de disques (figure 2.6). Cette étape, qui permet de déterminer la sensibilité du pathogène à plusieurs familles d'antibiotiques, repose à nouveau sur la croissance des pathogènes.



FIGURE 2.6 – Exemples de tests commerciaux de sensibilité aux antibiotiques : (A) E-test (bioMérieux) et (B) Sensi-Disc (BD).

Des automates de lecture (la gamme *Vitek2* (bioMérieux) par exemple) permettent désormais de combiner l'identification et la sensibilité aux antibiotiques, et permettent d'obtenir les résultats dans des délais plus brefs, de l'ordre de 3 à 7h.

# 2.1.7 Inconvénients de ce déroulement standard

Ces étapes successives permettent donc de détecter et d'identifier le pathogène à l'origine de l'infection, puis d'établir son profil de sensibilité aux antibiotiques, afin de déterminer le traitement le plus efficace, notamment la famille d'antibiotiques à utiliser ainsi que sa concentration minimale efficace pour éradiquer le pathogène. Ces informations, délivrées à temps, sont de nature à permettre la réorientation progressive de l'antibiothérapie pour cibler de plus en plus précisément le pathogène (figure 2.7).





FIGURE 2.7 – Déroulement standard des étapes pour le diagnostic des infections du sang et réorientation progressive de l'antibiothérapie.

Le diagnostic à partir d'hémocultures est considéré comme un test de routine, et représente environ un tiers de l'activité des laboratoires de microbiologie [Casier, 2004]. Pour le CHU de Grenoble, cela représentait 33 000 hémocultures par an en 2005 [Croize et al., 2007]. Cette succession d'étapes basées sur la croissance bactérienne a l'avantage de donner une information de phénotype bactérien, directement liée au comportement de la bactérie face à un antibiotique. Elle a en revanche un certain nombre d'inconvénients majeurs, qui sont passés en revue ci-dessous.

**Temps d'amplification** L'hémoculture repose sur une étape de multiplication du pathogène qui dure en moyenne 24 à 72 heures. Ce temps recouvre le temps nécessaire pour que les bactéries, stressées par le milieu très agressif du sang et par les antibiotiques et les modifications de conditions d'incubation liées au prélèvement puis au transport de l'échantillon, reprennent leur croissance : on parle de période de latence. Il recouvre aussi le temps nécessaire à l'obtention d'une concentration suffisante de bactéries pour que leur présence devienne clairement détectable. Il faut en général atteindre une concentration de  $10^8$  à  $10^9$  ufc/mL. C'est une méthode trop lente devant l'urgence de la situation.

**Peu sensible dans certaines circonstances** En outre, près de 50% des hémocultures restent négatives alors que les signes cliniques indiquent une infection [Dellinger et al., 2008].

En effet, la croissance du pathogène peut être potentiellement ralentie voire inhibée par des conditions stressantes comme la présence d'antibiotiques dans l'échantillon. De plus, les hémocultures sont peu sensibles pour la détection de bactéries intracellulaires ou fastidieuses, comme les genres *Bartonella, Legionella* ou encore *Brucella*. En outre, la concentration de micro-organismes dans le sang peut être très variable (pics de concentration séparés par des périodes de quasi-absence dans le sang). Le volume d'échantillonnage peut ne pas être suffisant pour garantir effectivement la présence de bactéries dans le volume de culture.

# 2.1.8 Bilan

Les tests qui requièrent une étape de culture ont donc une faible valeur ajoutée comme méthode de diagnostic car les résultats sont obtenus en général plusieurs jours après le prélèvement, et sont peu sensibles aux micro-organismes fastidieux ou au temps de génération long, ou encore lorsque le patient a déjà reçu une antibiothérapie.

La mise au point d'une méthode plus efficace et plus rapide pour détecter et identifier un pathogène à l'origine d'une infection du sang est un enjeu majeur pour les laboratoires, afin de permettre d'orienter efficacement et le plus tôt possible la décision thérapeutique et d'améliorer le pronostic vital des patients.

# 2.2 Nouvelles méthodes d'identification

Pour réduire le temps de détection des tests de diagnostic des infections du sang, de nouvelles méthodes apparaissent sur le marché. Le but principal de ces nouveaux systèmes est d'éviter les étapes de culture, qui sont chronophages et peu sensibles à certains micro-organismes. La stratégie utilisée consiste alors à détecter et identifier les pathogènes directement dans l'échantillon biologique.

# 2.2.1 Identification moléculaire

### 2.2.1.1 Introduction

Les méthodes moléculaires permettent la détection et l'identification d'un micro-organisme par reconnaissance d'une partie de son matériel génétique. En général, les tests moléculaires peuvent être effectués directement à partir de l'échantillon sanguin (c'est là qu'elles auront l'impact le plus fort sur l'orientation de la décision thérapeutique) ou après une étape de culture, soit à partir de l'hémoculture positive, soit à partir d'une colonie isolée. Dans la suite, nous ne parlerons que des méthodes moléculaires qui permettent d'obtenir un résultat à partir de l'échantillon brut, dans la mesure où les méthodes qui requièrent une première étape de culture présentent les mêmes limitations que les hémocultures décrites précédemment.

Le principe général consiste à amplifier une partie du génome dont la séquence est spécifique à l'identité du pathogène ou à des protéines connues pour être impliquées dans des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Les facteurs d'amplification génétique peuvent être gigantesques (jusqu'à 10<sup>12</sup> copies). C'est cette amplification qui peut permettre d'éviter l'étape de culture et la multiplication du pathogène entier en amplifiant uniquement son matériel génétique.

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'identifier un pathogène à partir de son génome, mais aussi de déterminer la présence de gènes associés à certains mécanismes de résistance aux antibiotiques (comme le gène *mecA* qui permet à *S. aureus* de résister à la méticilline [Ubukata et al., 1989]), même si peu de gènes de résistances ont été formellement identifiés. La possibilité d'identifier le pathogène sans étape de culture, et en outre de déterminer certaines caractéristiques de résistance aux antibiotiques, en font des méthodes très prometteuses.

Les tests moléculaires reposent en général sur une succession d'étapes qui permettent de libérer, amplifier et identifier le matériel génétique du pathogène. Ces méthodes nécessitent :

- la lyse du pathogène,
- l'extraction et la purification des acides nucléiques,
- l'amplification d'une ou plusieurs séquence(s) d'acides nucléiques,
- et l'identification des acides nucléiques amplifiés.

La lyse du pathogène se fait en général en utilisant des ultrasons ou des procédés chimiques ou mécaniques. L'extraction et la purification du matériel génétique reposent souvent sur l'utilisation de billes magnétiques (comme le kit *NucliSens mini MAG* (bioMérieux) ou le kit *MagNA Pure LC total nucleic acid isolation kit* (Roche)) ou de colonnes d'élution (comme le kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) ou le kit *High Pure PCR template preparation kit* (Roche)). La méthode d'amplification d'une séquence d'acide nucléique la plus couramment utilisée est la PCR (polymerase chain reaction) [Mullis et al., 1986], et l'identification du matériel amplifié peut se faire par séquençage, par migration sur un gel d'électrophorèse, par marquage fluorescent, ou par spectroscopie de masse.

# 2.2.1.2 Les différents tests moléculaires

Il existe ensuite 3 stratégies différentes pour le choix de la séquence à amplifier. On trouve :

- des tests spécifiques, qui permettent la détection d'une seule espèce donnée,
- des tests génériques, qui permettent la détection de n'importe quel pathogène,
- et des tests multiplexes, qui permettent la détection simultanée de plusieurs pathogènes.

**PCR universelle** La PCR universelle consiste à cibler une séquence d'ADN conservée par tous les micro-organismes, comme le gène ARNr 16s chez les bactéries ou le gène ARNr 18s chez les champignons.

Ces gènes peuvent être amplifiés à l'aide d'amorces universelles, mais comportent des séquences variables d'une espèce à l'autre, donc leur séquençage peut permettre l'identification du pathogène. Le principal avantage de cette méthode est de permettre la détection de n'importe quel pathogène, même s'il est rencontré pour la première fois. Le prix à payer pour cette universalité est néanmoins une identification plus complexe, puisqu'après l'amplification, il faut compléter l'analyse du gène par une méthode de séquençage par exemple, pour remonter à l'identification de la bactérie. Le séquençage reste une étape très coûteuse pour un test de diagnostic, mais permet une approche exhaustive. *SeptiTest* (Molzym) est un exemple de test universel disponible commercialement pour l'identification de pathogène dans le sang qui repose sur cette méthode.

**PCR spécifique** A l'inverse de l'amplification universelle, il est possible de cibler un gène particulier à une espèce en utilisant des amorces spécifiques. Si la séquence ciblée n'est pas présente dans le

génome du pathogène, il n'y aura pas d'amplification.

Une méthode de détection par PCR de *S. aureus* en moins de 2h directement dans le sang a été décrite récemment [Banada et al., 2012]. Elle repose sur l'utilisation d'un système automatisé dérivé de la plateforme *GeneXpert System* (Cepheid) et garantit un seuil de détection de 10 ufc/mL.

Néanmoins, le choix des sondes à utiliser pour la détection doit en général être guidé par une première observation microscopique du pathogène : en condition clinique, cette méthode ne permet donc pas de s'affranchir de l'étape d'hémoculture. En revanche, elle peut être particulièrement utile pour cibler un gène de résistance, comme le gène de résistance à la méticiline chez *S. aureus*.

**PCR multiplexe** La PCR multiplexe parait être un bon compromis entre les 2 méthodes. En effet, elle permet l'utilisation simultanée de plusieurs sondes spécifiques, donc permet de cibler plusieurs pathogènes différents dans un même test.

Plusieurs kits commerciaux permettent une détection de pathogène par PCR multiplexe directement dans le sang, notamment *SeptiFast* (Roche) et *VYOO* (Looxster). La plupart de ces systèmes permettent, en plus de l'identification du pathogène, de détecter la présence de certains gènes de résistance aux antibiotiques (en particulier la résistance à la méticilline, à la vancomycine, et à la famille des bêta-lactamines).

L'inconvénient majeur du multiplexage est une perte de sensibilité : mélanger plusieurs sondes PCR ciblant différents pathogènes peut induire une compétition entre les amplifications.

#### 2.2.1.3 Limitations

Les méthodes de détection et d'identification moléculaires semblent très prometteuses, notamment grâce à la possibilité d'effectuer des tests directement à partir de l'échantillon sanguin, sans passer par une hémoculture (tableau récapitulatif 2.1). Cela permet d'obtenir les résultats en quelques heures, ce qui est essentiel pour déterminer rapidement le traitement le mieux adapté pour le patient.

Tableau 2.1 – Méthodes commerciales de détection et d'identification de pathogènes directement à partir d'un prélèvement sanguine [Afshari et al., 2012] (+ données fournisseurs)

Produit	Technique de détection et d'identification	Nombre de pathogènes détectables	Limite de détection	Temps de réponse
SeptiTest (Molzym)	PCR universelle + séquençage	> à 345 pathogènes	20-40 ufc/mL	8-12h
Plex-ID (Abbott)	PCR universelle + multiplexe + ESI-MS <sup>2</sup>	> à 600 pathogènes	NA	8-12h
Vyoo (SIRS-Lab)	PCR multiplexe + gel d'électrophorèse	39 pathogènes	3-10 ufc/mL	8h
SeptiFast (Roche)	PCR multiplexe quantitative	25 pathogènes	3-300 ufc/mL	6h

2. ESI-MS : electrospray ionisation mass spectroscopy

Ces méthodes présentent malgré tout quelques inconvénients, en particulier une sensibilité limitée et un manque d'information sur la sensibilité aux antibiotiques des pathogènes détectés.

**Sensibilité limitée** Dans 50% des cas d'infection du sang chez les adultes, la concentration en pathogène dans la circulation sanguine est inférieure à 1 ufc/mL [Lamy, 2005]. Etant donné que les tests commerciaux détectent en général la présence de pathogènes à partir de 10 ufc/mL, cela peut fortement limiter leurs applications cliniques pour l'instant.

La sensibilité des méthodes moléculaires dépend principalement de la quantité et de la qualité du matériel génétique extrait à partir de l'échantillon brut. En effet, avant l'étape d'amplification, il faut rendre l'ADN du pathogène accessible en lysant la paroi du micro-organisme. Cette étape peut être limitante pour certains pathogènes particulièrement résistants. De plus, une fois l'ADN libéré, de nombreuses substances dans le sang peuvent inhiber la PCR, et en particulier l'hémoglobine [Wilson, 1997]. Avant d'amplifier une séquence d'acides nucléiques, il faut donc purifier l'échantillon, afin d'éliminer toutes les substances qui pourraient inhiber la réaction et conduire à des faux négatifs. Cette étape de purification permet en général d'éliminer aussi l'ADN humain présent dans l'échantillon, et donc de n'amplifier que l'ADN du pathogène pour faciliter sa détection [Handschur et al., 2009].

Ce sont généralement ces méthodes d'extraction qui limitent la sensibilité des méthodes moléculaires. Hormis les exemples cités ci-dessus, les kits commerciaux d'extraction affichent très souvent un seuil de détection autour de 10<sup>3</sup>ufc/mL [Podnecky et al., 2013] [Krulova et al., 2009]. Pour améliorer la sensibilité des tests moléculaires, il faut donc se concentrer sur l'amélioration des méthodes de préparation des échantillons.

**Sensibilité aux antibiotiques** Le manque d'information sur la sensibilité aux antibiotiques est une autre grande limitation des tests moléculaires. En effet ces données sont essentielles pour orienter l'antibiothérapie prescrite au patient. Seule la présence de quelques gènes de résistance peut être confirmée, principalement le gène de résistance à la méticilline chez *S. aureus*. En outre, la présence d'un gène de résistance ne garantit pas l'apparition du mécanisme de résistance chez le pathogène, puisque l'expression du gène dépend aussi de nombreuses conditions extérieures. Ces données sont donc rarement suffisantes, et ne permettent pas d'éviter les méthodes de culture traditionnelles pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques du pathogène.

**Remise en question de l'intérêt clinique de certains cas détectés positifs** Ces nouvelles méthodes moléculaires affichent en général des taux de détection plus fréquents que les méthodes de cultures : elles peuvent se révéler positives alors que les hémocultures restent négatives. C'est le cas notamment pour les pathogènes fastidieux ou au temps de génération très long, ou lorsque des antibiotiques auraient déjà été administrés au patient avant le prélèvement. Cela justifie largement leur avantage en matière de diagnostic par rapport aux méthodes traditionnelles. Cependant, en abandonnant l'étape de croissance, les tests moléculaires détectent indifféremment la présence de pathogènes vivants

ou morts, mais aussi la présence d'ADN circulant, ce qui explique aussi pourquoi les méthodes moléculaires détectent plus fréquemment la présence de pathogènes. Aucune étude ne permet pour l'instant de justifier l'intérêt clinique de la détection de pathogènes morts dans la circulation sanguine. Ces détections peuvent donc conduire à davantage de faux-positifs par rapport aux méthodes de culture.

# 2.2.2 Identification chimiométrique

De nouvelles méthodes d'identification basées sur la composition protéique du pathogène se développent ces dernières années pour concurrencer les méthodes moléculaires basées sur l'amplification du génome du micro-organisme qui présentent certaines limites. Elles reposent sur la détermination de signatures chimiques des micro-organismes, qui dépendent de la composition du pathogène. Ces signatures sont ensuite comparées aux signatures de pathogènes connus dans de vastes banques de données pour permettre leur identification.

# 2.2.2.1 Spectrométrie de masse

La spectroscopie de masse est une méthode d'analyse qui permet de caractériser finement des molécules en fonction de leur masse et de leur charge. La technique MALDI-TOF est la méthode de spectroscopie de masse plus couramment utilisée pour l'identification de pathogènes [Claydon et al., 1996]. Elle repose sur l'association d'une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et d'un analyseur à temps de vol (TOF = Time of Flight). En bref, cette technique consiste à mélanger l'échantillon avec une matrice, puis à illuminer ce mélange avec un laser, pour entrainer l'ionisation du mélange et sa désorption. Les ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique et séparés en fonction du temps qu'ils mettent pour atteindre le détecteur. Ce temps dépend de leur rapport masse/charge, les ions ayant un rapport masse/charge le plus faible arrivant le plus rapidement au niveau du détecteur. Chaque ion du mélange sera détecté sous forme d'un pic et l'ensemble des pics forme un spectre spécifique à chaque pathogène. Plusieurs appareils d'analyse microbiologique basés sur la technologie MALDI-TOF sont commercialisés, comme les systèmes *Vitek-MS* (bioMérieux), *AccuPRO-ID* (Accugenix) ou encore *MALDI Biotyper* (Bruker).

Cette technique permet une identification très rapide du pathogène (en quelques minutes) grâce à la comparaison du spectre obtenu avec ceux stockés dans des bases de données. Cependant l'acquisition d'un spectre reproductible requiert pour l'instant une quantité importante de matériel biologique en entrée du système (en général une colonie, soit 10<sup>7</sup> ufc). Cette méthode ne peut donc être utilisée qu'avec un échantillon dans lequel la charge bactérienne est importante, donc après une étape de culture.

Les protocoles standards permettent ainsi la détection à partir d'une colonie isolée ou d'un culot de bactéries isolées à partir d'une hémoculture positive. La qualité de l'identification dépend en



FIGURE 2.8 – Spectromètre de masse MALDI-TOF *microFlex* (Brucker)) et spectre typique d'un pathogène.

grande partie du nombre de spectres références dans la base de données. En particulier, les infections polymicrobiennes sont particulièrement difficiles à identifier [La Scola and Raoult, 2009].

#### 2.2.2.2 Spectroscopie optique

La spectroscopie Raman est une méthode vibrationnelle basée sur la réflexion inélastique de la lumière, et permet de détecter la présence de liaisons moléculaires spécifiques. Chaque molécule possède un spectre particulier, et un pathogène aura donc une signature Raman singulière, qui dépend de sa composition chimique (figure 2.9). L'identification du pathogène se fait là-aussi par comparaison entre le spectre acquis et une base de données.



FIGURE 2.9 – Spectromètre Raman (*Xplora Raman microscope* (Horiba)) et spectre typique d'un pathogène.

L'acquisition d'un spectre peut se faire directement à partir d'une boite de culture, après une étape de croissance de 6 à 8h (donc sur une micro-colonie, soit quelques centaines de ufc) [Maquelin et al., 2003]. C'est une technique très sensible, qui permet même une première classification directement à partir d'une cellule unique [Huang et al., 2004].

D'autres modalités de spectroscopie optique ont également été utilisées pour l'identification bactérienne sur des quantités réduites de biomasse, comme la spectroscopie de fluorescence endogène et la spectrométrie infra-rouge.

# 2.2.2.3 Limitations

**Résistance aux antibiotiques : encore trop peu de données** A l'instar des techniques moléculaires, quelques mécanismes de résistance peuvent aussi être identifiés par spectrométrie de masse [Edwards-Jones et al., 2000] ou par spectroscopie Raman [Kastanos et al., 2006]. Cependant ces données sont encore insuffisantes pour caractériser précisément la sensibilité aux antibiotiques des pathogènes. Il faut donc souvent les compléter avec les méthodes traditionnelles d'antibiogrammes.

**Préparation d'échantillon nécessaire** Les méthodes protéiques sont particulièrement prometteuses grâce à leur sensibilité. En spectroscopie Raman par exemple, il est désormais possible d'acquérir des spectres reproductibles sur bactérie unique. Néanmoins ces méthodes donnant une information de composition chimique globale du volume analysé, il est nécessaire d'extraire au mieux les micro-organismes à analyser de leur environnement complexe et de les placer dans un milieu de composition chimique connue et invariable, pour diminuer le bruit de fond. Ces méthodes nécessitent donc une étape d'extraction des pathogènes avant de pouvoir les caractériser.

# 2.3 Conclusion : un vrai besoin pour de nouvelles méthodes de préparation d'échantillon

Le tableau 2.2 résume les caractéristiques des principales méthodes de détection et d'identification de pathogènes dans le sang. La détection directe de pathogènes dans le sang est une approche prometteuse car elle permet de s'affranchir des étapes de culture qui retardent les résultats d'identification et de sensibilité aux antibiotiques. Pour remplir cet objectif, les techniques moléculaires et protéiques sont en plein essor, et permettent une identification en quelques heures. Cependant la sensibilité requise pour détecter directement dans le sang une très faible concentration de pathogènes (1 ufc/mL) n'est pas encore atteinte. Les méthodes moléculaires sont particulièrement limitées par la présence d'inhibiteurs dans le sang : une méthode fiable d'extraction des acides nucléiques du pathogène est donc essentielle. Les méthodes protéiques quant à elles possèdent une sensibilité suffisante pour identifier une bactérie unique, mais sont mises en défaut lors d'une analyse directe de l'échantillon biologique à cause d'un bruit de fond trop élevé. Une étape de séparation des pathogènes est donc nécessaire avant l'identification.

En conclusion, de nouvelles méthodes d'identification se montrent très prometteuses, mais le développement des méthodes d'extraction est encore nécessaire pour en augmenter la sensibilité, afin de détecter directement la présence de pathogènes dans le sang. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette direction. Il s'agit de mettre au point une étape de préparation d'échantillon qui permettrait d'extraire et de concentrer les pathogènes à partir d'un échantillon de



FIGURE 2.10 – Schéma récapitulatif des différentes étapes du diagnostic traditionnel des septicémies et des nouvelles méthodes émergentes.

sang. Par rapport au déroulement des méthodes standards, cette étape d'extraction intervient donc juste après le prélèvement, en amont des étapes d'identification. Elle permettrait d'éviter les étapes d'amplification et d'isolement (figure 2.10).

Cette étape d'extraction et de concentration doit permettre de répondre à une problématique complexe. Elle doit être très efficace, puisque le nombre de cibles dans l'échantillon brut est faible et doit permettre de traiter un gros volume d'échantillon (entre 1 et 10 mL, pour que statistiquement l'échantillon contienne au moins un pathogène). En outre, pour être la plus générale possible, cette nouvelle méthode d'extraction doit pouvoir être complétée par n'importe quel test d'identification et/ou de sensibilité aux antibiotiques : la préparation de l'échantillon doit donc se faire sans marquage (pour ne pas imposer un bruit de fond trop important pour la spectroscopie Raman par exemple) et sans altérer la viabilité les micro-organismes (puisque les méthodes de culture occupent encore un rôle important dans les protocoles standard, notamment pour déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques). Tableau 2.2 – Tableau récapitulatif des principales méthodes de détection et d'identification de pathogènes dans le sang

Principe Avantages Inconvénients	amplification du nombre de micro- permet de discriminer les pathogènes peu sensible si traitement antibiotique déjà organismes par mise en culture vivants et morts donné donné donné peu sensible pour les organismes dont le possibilitéde poursuivre l'analyse avec peu sensible pour les organismes dont le un antibiogramme femps de génération est long méthode de référence long	après une tests biochimiques méthode de référence long	noléculaire amplification d'une partie du génome détection et identification rapides pas de données sur le profil phénotypique de pas d'influence des antibiotiques susceptibilité du pathogène risque de contamination détection d'ADN bactérien et non de bactéries vivantes	ique acquisition d'un spectre qui reflète la identification rapide méthode d'extraction à prévoir composition chimique du pathogène très sensible peu de données sur le profil phénotypique de susceptibilité du pathogène
M éthode Pri	Hémoculture am or,	ldentification phénotypique après une te hémoculture positive	ldentification par biologie moléculaire arr directement dans l'échantilion	Identification par profil protéomique ac

# **Partie II**

# Microsystèmes pour le tri cellulaire

L'objectif de cette partie est de déterminer les avantages des microsystèmes pour le tri cellulaire à partir d'échantillons complexes. Le chapitre 3 présente l'état de l'art des différentes méthodes microfluidiques pour l'extraction d'une sous-population à partir d'échantillons biologiques, et plus particulièrement des échantillons sanguins. Il répertorie les avantages et inconvénients de ces différentes méthodes de tri et permet de déterminer l'approche la plus pertinente pour répondre à notre objectif. Le chapitre 4 présente une validation expérimentale préliminaire de cette approche, et propose une stratégie d'extraction des micro-organismes dans un échantillon de sang grâce à l'utilisation de deux modules microfluidiques associés en série : un module d'échange de milieu et un module de DEP pour l'optimisation du tri cellulaire.

# **3** État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

Le but général des travaux présentés dans ce manuscrit est de mettre au point un système qui soit capable d'isoler des pathogènes en très faible concentration dans un échantillon sanguin, pour accélérer le diagnostic des septicémies. Cette méthode doit être rapide, générique, de préférence sans marquage, et non létale pour les micro-organismes. Nous allons donc examiner les méthodes existantes qui permettent d'extraire une sous-population cellulaire dans un échantillon sanguin, de s'interroger sur leur compatibilité avec notre problématique, pour enfin dégager les méthodes les plus prometteuses qui pourraient s'adapter à nos besoins.

# 3.1 Le domaine du tri et de l'extraction de particules biologiques

# 3.1.1 Tests d'extraction de cellules particulières dans le sang

La problématique initiale du travail présenté ici est l'extraction d'une sous-population de cellules (les pathogènes) présentes à très faible concentration dans un échantillon sanguin. Il existe d'autres tests cliniques qui doivent répondre à une problématique proche de la nôtre et dont nous pourrions nous inspirer :

- En oncologie, le dénombrement de cellules tumorales circulantes (CTC) à partir d'un échantillon de sang (de 1 à plusieurs centaines de cellules/mL [Miller et al., 2009]) permet de quantifier le risque de formation de métastases. Dans ce cas, il faut aussi être capable de détecter un très faible nombre de cellules parmi plusieurs milliards de cellules sanguines.
- Dans un autre domaine, la recherche de globules rouges nucléés du fœtus dans le sang de la femme enceinte est une étape clé pour un diagnostic prénatal [Bianchi et al., 1990]. On cherche ici à extraire une dizaine de cellules par mL de sang.
- D'autres tests ciblent des sous-populations plus abondantes, comme le dénombrement de cellules CD4+ pour le suivi des traitements des patients infectés par le VIH [Masur et al., 1989] (en général on trouve moins de 500 cellules CD4+/ $\mu$ L de sang chez une personne atteinte du VIH).
- Enfin, certains tests de routine exigent l'extraction d'une sous-population principale du sang, comme les globules blancs pour en extraire de l'ADN ou les plaquettes pour étudier les troubles de la coagulation.

### 3.1.2 Méthodes classiques d'extraction

La problématique de séparation d'une sous-population dans un échantillon sanguin est donc une étape courante dans les laboratoires d'analyses. Il existe plusieurs méthodes utilisées en routine qui permettent de remplir cet objectif.

**Centrifugation** La méthode la plus couramment utilisée en laboratoire pour séparer des cellules dans un échantillon biologique est la centrifugation. Les cellules sont séparées en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge (figure 3.1 A). Pour faciliter la séparation des cellules, une alternative consiste à ajouter à l'échantillon un milieu de densité intermédiaire (généralement du Ficoll [Noble and Cutts, 1967], de densité supérieure à celle de la plupart des globules blancs mais inférieure à celle des globules rouges), qui permet de mieux séparer les différentes populations cellulaires (figure 3.1 B).



FIGURE 3.1 – (A) séparation des populations cellulaires en fonction de leur densité et (B) principe de séparation en présence d'une barrière de densité.

Cette technique reste manuelle, demande une certaine dextérité pour le prélèvement de cellules cibles, et n'est pas vraiment adaptée pour extraire une population cellulaire en faible concentration.

**Lyse et centrifugation** Pour faciliter l'extraction de pathogènes, une méthode consiste à lyser l'ensemble des cellules sanguines, puis à centrifuger l'échantillon et à récupérer le culot, qui ne contient alors que les espèces ayant résisté à l'étape de lyse sélective. La lyse sélective des cellules sanguines est possible car la membrane externe ainsi que la paroi des micro-organismes leur permet de mieux résister aux agressions extérieures (lyse par choc osmotique ou lyse par agent chimique qui attaque la membrane des cellules).

Le système *Isolator* commercialisé par Alere utilise cette stratégie pour inoculer sur un milieu de culture solide des pathogènes directement après le prélèvement de l'échantillon dans un tube contenant de la saponine (agent permettant une lyse chimique), sans passer par l'étape de l'hémoculture. Ce système présente un atout certain pour l'isolement de micro-organismes intra-cellulaires, qui se retrouvent libérés lorsque les cellules sanguines sont lysées. Cependant, à cause d'un nombre d'étapes manuelles important, le système Isolator présente un risque de contamination très élevé, et un défaut de sensibilité pour certains micro-organismes, comme *Streptococcus pneumoniae* [Henry et al., 1983] ou *Brucella melitensis* [Yagupsky et al., 1997]. Certains composés chimiques dans le tampon de lyse peuvent inhiber la croissance de bactéries, et notamment certaines souches de mycobactéries [Wasilauskas and Morrell, 1994].

**Filtration** La filtration est un procédé qui permet de séparer différentes populations cellulaires en fonction de leur taille. La dimension des pores du filtre permet de sélectionner la sous-population que l'on souhaite récupérer. Cette technique n'est cependant pas très adaptée aux échantillons très concentrés comme le sang, car les cellules obstruent facilement les pores du filtre ce qui aboutit au colmatage de ce dernier.

**Supports fonctionnalisés** Une autre méthode consiste à utiliser des supports fonctionnalisés (comme des particules magnétiques [Miltenyi et al., 1990]) avec lesquels les cellules d'intérêt vont se lier spécifiquement (par affinité électro-statique, covalente, par interaction anticorps-antigène,...). Une étape d'élution peut ensuite permettre de remettre en suspension des cellules capturées. Cette étape de relargage reste la plupart du temps très problématique, car les interactions entre le substrat et les cellules cibles sont souvent difficiles à affaiblir.

Le système commercial *CellSearch* (Veridex) est la méthode de référence pour isoler les CTC dans le sang [Cristofanilli et al., 2004]. Il utilise des particules magnétiques fonctionnalisées par des anticorps qui viennent se fixer aux cellules. Cette méthode est très efficace pour la capture de cellules, et le dénombrement se fait directement par observation microscopique après marquage fluorescent, sans séparer les cellules des particules magnétiques.

Outre le fait que la capture des cellules est souvent irréversible et se fait dans des conditions de tampon qui peuvent perturber les étapes suivantes des protocoles de caractérisation, cette méthode de fonctionnalisation de surface n'est pas vraiment adaptée lorsqu'on ne connait pas l'identité de la cellule que l'on veut capturer. En effet, si la nature de la cible n'est pas connue en avance (dans notre cas, on ne sait pas si la cellule cible est une levure, une bactérie Gram+ ou une bactérie Gram-), il est difficile de sélectionner les bons anticorps pour cibler le pathogène.

**Cytométrie en flux** La méthode de référence pour analyser et trier des cellules dans un échantillon biologique est la cytométrie en flux [Crosland-Taylor, 1953]. Elle permet d'analyser et de trier les cellules individuellement en fonction de leur propriété optique lorsqu'elles traversent un laser (figure 3.2). Pour faciliter la discrimination d'une population dans l'échantillon, les cellules d'intérêt sont généralement repérées par un marquage fluorescent [Bonner et al., 1972]. C'est cette technique qui est utilisée en général pour dénombrer le nombre de CD4+ chez les patients atteints du VIH.



Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

FIGURE 3.2 – Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux  $^1$ .

Les cytomètres en flux permettent en général un tri à une cadence de 10 000 à 25 000 cellules/s, en fonction de la pureté de l'échantillon final que l'on souhaite (données techniques du cytomètre en flux *FACSAria III* (BD)). Pour analyser un mL de sang qui contient plusieurs milliards de cellules, il faudrait plus de 24h. Cette méthode n'est donc pas adaptée aux gros volumes d'échantillons avec une forte complexité particulaire.

# 3.2 Essor de la microfluidique

Les méthodes standards de laboratoire ne permettent pas de répondre convenablement à la problématique complexe qui est posée, à savoir l'extraction de quelques cellules cibles dans un large volume d'échantillon.

Cependant un domaine ouvre de nouvelles perspectives pour le tri cellulaire : la microfluidique. C'est un domaine qui permet de manipuler des fluides dans des canaux de quelques centaines de microns de large, voire parfois beaucoup moins. Ce changement d'échelle par rapport aux méthodes traditionnelles modifie le comportement des fluides [Squires and Quake, 2005] et permet d'explorer d'autres pistes pour le tri cellulaire, avec notamment la possibilité d'exploiter de nouvelles propriétés intrinsèques des cellules (en plus de la taille ou la présence d'antigènes) comme critères de tri.

# 3.2.1 Intérêt : intégration

Outre le fait de permettre l'exploitation de nouvelles pistes pour le tri cellulaire, la microfluidique présente l'avantage de pouvoir intégrer sur un même dispositif toute une chaîne d'analyse, qui

<sup>1.</sup> source : https://www.imagif.cnrs.fr

comprend un protocole complet de laboratoire sur un dispositif miniaturisé. Les microsystèmes sont capables de reproduire à petite échelle la plupart des fonctions standards d'un laboratoire. On parle couramment de LOC (pour Lab-On a Chip<sup>2</sup>) ou de  $\mu$ TAS (pour micro total analysis system<sup>3</sup>).

Au départ plutôt consacrés à la chimie analytique [Manz et al., 1990], les systèmes microfluidiques sont en plein essor dans de nombreux domaines [Whitesides, 2006], et en particulier dans le secteur du diagnostic médical [Yager et al., 2006] [Schulte et al., 2002].

Ces méthodes sont également considérées comme prometteuses pour le diagnostic car elles permettent de diminuer les quantités de réactifs utilisés pour chaque test (qui sont souvent très coûteux en biologie), d'automatiser les tests, donc de réduire les risques d'erreur et de contamination. Mais surtout, l'intégration des différentes étapes d'un protocole (comme le mélange, la séparation, les réactions chimiques, la capture ou la détection) permet un réel gain de temps. La microfluidique est donc présentée comme une voie très prometteuse pour améliorer la qualité du diagnostic *in vitro*, en raccourcissant au maximum le temps d'analyse par l'intégration de toutes les étapes d'un test sur un même dispositif.

# 3.2.2 Microfluidique pour le diagnostic in vitro

Pour le diagnostic *in vitro*, le principal avantage de la microfluidique est de pouvoir coupler la séparation, la détection et l'identification d'une cible à partir d'un échantillon complexe. De plus en plus de tests de diagnostic s'appuyant sur la microfluidique sont commercialisés chaque année [Chin et al., 2012]. Sans en faire un inventaire exhaustif, nous pouvons citer quelques exemples particuliers.

Le dispositif *iSTAT* (Abbott) (figure 3.3 A) permet d'effectuer la plupart des analyses biochimiques standards du sang, comme la détermination du taux de glucose, de sodium ou de potassium. Il permet aussi la mesure du temps de coagulation pour le suivi des patients sous traitement anticoagulant oral. Il fonctionne à l'aide de cartouches microfluidiques plastiques dédiés pour la (ou les) analyse(s) d'intérêt, intégrant un composant en silicium avec des électrodes fonctionnalisées, et la détection se fait par électrochimie [Martin, 2010].

La société Abaxis, avec le système *Piccolo Express* (figure 3.3 B) permet aussi d'effectuer de nombreux tests d'analyse biochimique du sang, mais cette fois-ci par mesure d'absorbance en utilisant des consommables en forme de disques contenant des réactifs embarqués, et utilise la force centrifuge pour déplacer l'échantillon dans le consommable. Le principe de l'utilisation d'un disque et de la force centrifuge pour déplacer les liquides en micro-fluidique (on parle souvent de *Lab-on-a-CD* [Madou et al., 2006]) permet aussi par exemple à la société Focus Diagnostics de développer des tests de détection PCR de pathogènes comme la grippe avec le test *Simplex Flu A/B & RSV Direct Kit*.

Un autre format de la microfluidique est exploité par la société Advanced Liquid Logic (ALL) (figure 3.3 C) qui commercialise des tests enzymatiques pour le dépistage de maladies rares chez le nouveau-né : la microfluidique digitale, qui consiste à manipuler des gouttes plutôt qu'un écoule-

<sup>2.</sup> laboratoires sur puce

<sup>3.</sup> microsystèmes d'analyse totale

Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques



FIGURE 3.3 – Exemples de dispositifs microfluidiques commerciaux (A) Abbott I-STAT (http ://www.abbottpointofcare.com) (B) Abaxis - Piccolo Express (http ://www.abaxis.com) (C) ALL (www.liquid-logic.com) (D) Diagnostic For All (http://www.dfa.org) [Martinez et al., 2008].

ment continu. Le déplacement des gouttes est ici contrôlé par électro-mouillage.

Citons pour finir Diagnostic for all (figure 3.3 D) qui met au point des dispositifs microfluidiques sur papier [Martinez et al., 2008] principalement pour les pays en voie de développement, pour le suivi des femmes enceintes (diabète gestationnel, pré-éclampsie, anémie) ou encore la surveillance de la fonction hépatique pour les personne sous traitement antiviral.

La diversité de ces systèmes en terme de matériaux utilisés, de méthode de déplacement du fluide, ou encore de détection (tableau 3.1) illustre le potentiel immense de la microfluidique pour l'élaboration de nouveaux tests de diagnostic.

Tableau 3.1 – Caractéristiques de quatre systèmes de diagnostic *in vitro* micro-fluidiques qui reflètent la diversité des tests. D'après [Chin et al., 2012].

	matériau	déplacement du fluide	détection du résultat
Abaxis	disque plastique	centrifugation	absorbance
Abott I-STAT	carte hybride plastique + silicium	actionnement pneumatique	électrochimie
ALL	verre + électrodes	électro-mouillage	fluorescence
Diagnostic for All	papier	capillarité	colorimétrie

Même si certains produits microfluidiques commencent à être commercialisés, la plupart des études

restent pour l'instant dans les laboratoires de recherche. En effet, les étapes d'analyse sur puce ont été largement étudiées, en écartant pendant (trop) longtemps la préparation de l'échantillon [Mariella, 2008]. Les microsystèmes fonctionnent souvent avec une solution 'simple' en entrée, et imposent une première étape manuelle de préparation de l'échantillon. Pour résoudre ce problème, il convient donc d'approfondir la recherche de nouvelles méthodes de décomplexification des échantillons qui puissent être intégrées en microsystèmes. C'est précisément sur ce point bloquant qu'ont porté les travaux présentés dans ce manuscrit.

# 3.3 La mécanique des fluides dans les systèmes miniaturisés

Afin de cerner les avantages que peuvent apporter les microsystèmes, et comprendre pourquoi la microfluidique est en plein essor, nous nous attarderons dans cette partie sur les caractéristiques des fluides en microsystèmes. En effet, à l'échelle microscopique, les fluides ne se comportent pas de la même manière qu'à l'échelle macroscopique [Purcell, 1977]. Les nouveaux concepts de tri cellulaire tirent souvent parti de ces phénomènes.

#### 3.3.1 Régime laminaire

Le nombre de Reynolds (équation 3.1) est un nombre adimensionné fréquemment utilisé en mécanique des fluides pour caractériser le régime d'un écoulement. Il permet de quantifier l'importance relative des forces d'inertie par rapport aux forces de viscosité et fixe les limites d'application des modèles d'écoulement laminaire et turbulent. Il est issu de l'adimensionnement de l'équation de Navier-Stokes (équation 3.2) (sous les hypothèses d'un fluide visqueux newtonien et d'un écoulement incompressible) :

$$Re = \frac{[\text{terme convectif}]}{[\text{terme visqueux}]} = \frac{UL\rho}{\eta}$$
(3.1)

$$\frac{\partial \vec{U}}{\partial t} + \underbrace{(\vec{U}.\vec{\nabla})\vec{U}}_{\text{terme convectif}} = -\frac{1}{\rho}\vec{\nabla}p + \underbrace{\frac{\eta}{\rho}\Delta\vec{U}}_{\text{terme visqueux}}$$
(3.2)

où  $\vec{U}$  désigne la vitesse de l'écoulement (en m.s<sup>-1</sup>), *p* la pression (en Pa),  $\rho$  et  $\eta$  respectivement la masse volumique (en kg.m<sup>-3</sup>) et la viscosité dynamique (en Pa.s<sup>-1</sup>) du fluide, et *L* la dimension caractéristique de l'écoulement (en m).

On peut définir deux régimes d'écoulement en fonction de la valeur du nombre de Reynolds :

- si *Re* > 2000, on parle d'écoulement turbulent (figure 3.4 A),
- si Re < 2000, on parle d'écoulement laminaire (figure 3.4 B).

#### Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques





Dans les dispositifs microfluidiques, le nombre de Reynolds est généralement compris entre  $10^{-4}$  et 1 (tableau 3.2) : le régime fluidique est donc laminaire. Cela signifie qu'en l'absence d'obstacles ou de forces extérieures, les particules suivent des trajectoires parallèles, dans la direction de l'écoulement du fluide.

Tableau 3.2 – Paramètres expérimentaux utilisés pour calculer les grandeurs caractéristiques de l'écoulement

dimension caractéristique	vitesse de	viscosité dynamique	masse volumique	nombre de Reynolds
du micro-système	l'écoulement	du fluide	du fluide	caractéristique
1-500µm	$100 \ \mu m. \ s^{-1}$ - $1 \ mm. \ s^{-1}$	1 10 <sup>-3</sup> Pa.s	$1000 \text{ kg. m}^{-3}$	$10^{-4}$ - 0.5

Le mélange entre deux liquides ne peut donc se faire que par diffusion latérale. Le temps de diffusion est proportionnel au carré de la distance à parcourir, et peut être déterminé par la relation suivante :

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \tag{3.3}$$

où *x* (en m) est la distance moyenne parcourue pendant la durée *t* (en s) et D le coefficient de diffusion (en m<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>). Pour une particule sphérique, D peut être calculée par la loi de Stokes-Einstein [Einstein, 1905] :

$$D = \frac{RT}{N_a} \frac{1}{6\pi\eta r}$$
(3.4)

où *R* est la constante universelle des gaz parfaits (en J. m<sup>-1</sup>. K<sup>-1</sup>), *T* la température (en K),  $N_a$  la constante d'Avogadro (en mol<sup>-1</sup>),  $\eta$  la viscosité dynamique (en Pa.s) du fluide dans lequel est plongée la particule de rayon *r* (en m). Ainsi, une particule sphérique de quelques µm de diamètre dans de

<sup>4.</sup> d'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Écoulement\_laminaire

l'eau parcourra une distance moyenne de l'ordre du  $\mu$ m en 10 secondes. Dans un système laminaire, le mélange est donc très limité pour des particules de taille équivalente à celles des micro-organismes ou des cellules (entre 1 et 20  $\mu$ m), et ces conditions sont donc propices pour la séparation efficace de cellules, par l'application d'une force extérieure par exemple.

#### 3.3.2 Action d'une force extérieure

A faible nombre de Reynolds, on peut approximer la force visqueuse qui s'oppose au mouvement de la particule par la loi de Stokes :

$$\vec{F}_{Stokes} = -6\pi\eta r\,\vec{v} \tag{3.5}$$

où *v* est la vitesse de la particule (en m.s<sup>-1</sup>) *r* le rayon de la particule (en m) et  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s).

Lorsqu'une force extérieure agit sur la particule (en l'absence d'écoulement), le bilan des forces peut donc s'écrire :

$$\vec{F}_{ext} + \vec{F}_{Stokes} = m \frac{d\vec{v}}{dt}$$
(3.6)

En intégrant l'équation 3.6 on obtient :

$$v(t) = \frac{F_{ext}}{6\pi\eta r} + (v_0 - \frac{F_{ext}}{6\pi\eta r})e^{-t/\tau}$$

$$avec \ \tau = \frac{m}{6\pi\eta r}$$
(3.7)

où  $v_0$  est la vitesse initiale de la particule (en m.s<sup>-1</sup>) et *m* la masse de la particule (en kg).

Pour une particule de quelques  $\mu$ m de diamètre,  $\tau$  est de l'ordre de la  $\mu$ s, ce qui signifie que la vitesse atteint très rapidement son régime permanent, et donc que la durée de la phase d'accélération est négligeable. La vitesse de la particule est donc directement proportionnelle à l'intensité de la force imposée.

#### 3.3.3 Profil parabolique

Une force peut donc imposer une vitesse de déplacement à une particule, qui s'ajoute à la vitesse de l'écoulement. Dans un canal microfluidique, le champ de vitesse n'est pas uniforme : la vitesse est nulle sur les parois du canal (fluide visqueux) et maximale au centre du canal. La loi de Poiseuille permet de décrire la vitesse d'un écoulement laminaire d'un fluide visqueux dans une conduite cylindrique et permet en particulier d'exprimer la vitesse d'une particule en fonction de sa hauteur *r* 

(en m) dans l'écoulement (figure 3.5) :

$$v(r) = \frac{R^2}{4\eta} \frac{\Delta p}{L} (1 - \frac{r^2}{R^2})$$
(3.8)

où *R* et *L* sont respectivement le rayon et la longueur de la conduite (en m),  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s) et  $\Delta p$  la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal (en Pa).



FIGURE 3.5 – Ecoulement de Poiseuille dans une conduite cylindrique : profil de vitesse parabolique (flèches bleues).

On déduit de cette formule que la vitesse moyenne des particules dans le canal est égale à la moitié de la vitesse des particules au centre du canal (équation 3.9).

$$v_{moyen} = \frac{v_{max}}{2} \tag{3.9}$$

Les particules au centre du canal parcourent le canal plus rapidement que les particules qui se situent à proximité des parois (voir figure 3.5). Cette propriété bien connue des microsystèmes est une des pistes explorées pour la séparation de particules dans un écoulement laminaire : en positionnant les cellules à des hauteurs différentes (en utilisant une force verticale qui s'oppose à la gravité), elles se déplacent chacune avec une vitesse propre, et atteindront la sortie du canal à des temps différents. Dans la littérature, cette technique est appelée *Field Flow Fractionnation* [Reschiglian et al., 2005] [Giddings, 1993].

# 3.3.4 Bilan

Dans les systèmes microfluidiques, l'écoulement est laminaire. Le nombre de Reynolds, qui exprime le rapport entre les forces d'inerties et les forces visqueuses est faible, donc les forces d'inertie sont négligeables. Les particules suivent la direction de l'écoulement du fluide, sauf si elles sont déviées par des obstacles ou par une force extérieure. Ce comportement peut être mis à profit pour séparer différentes populations cellulaires.

De plus en plus de techniques de séparation microfluidiques se développent depuis une décennie, et de nombreuses publications en font leur analyse et leur comparaison [Yun et al., 2013] [Autebert et al.,

2012] [Gossett et al., 2010] [Bhagat et al., 2010] [Pamme, 2007] [Radisic et al., 2006]. Les techniques sont en général divisées en deux catégories, en fonction du mode de séparation. Les méthodes dites *actives* reposent sur l'utilisation d'un champ de force extérieur qui induit une force discriminante sur les cellules, alors que les méthodes dites *passives* reposent entièrement sur la géométrie du canal microfluidique et les forces hydrodynamiques qui en découlent.

# 3.4 Méthodes passives

Les méthodes passives permettent d'effectuer un tri entre différentes populations cellulaires en utilisant une géométrie particulière du canal, couplée parfois une fonctionnalisation de surface, sans aucune force extérieure hormis celle qui met en mouvement l'écoulement.

# 3.4.1 Tri en fonction de la présence d'antigènes

Comme pour les systèmes macroscopiques, de nombreux systèmes microfluidiques permettent la capture de cellules par interaction spécifique entre la composition de leur membrane et une fonctionnalisation de surface du microsystème. La réduction de la taille des canaux permet d'augmenter le rapport surface fonctionnalisée/volume d'analyse, et donc la probabilité de contact avec la cellule dans un écoulement. L'élution des cellules peut ensuite se faire en augmentant le débit dans le microsystème [Murthy et al., 2004], ou en modifiant la température, le pH ou la force ionique du tampon [Reverberi and Reverberi, 2007].



В



FIGURE 3.6 – Micropiliers (A) pour la capture de CTC dans le sang [Nagrath et al., 2007] et (B) pour la capture de bactéries dans le sang [Hwang et al., 2008].

La figure 3.6 illustre des structurations au sein de microsystèmes qui permettent la capture de cellules spécifiques sur des micropiliers fonctionnalisés. La microfluidique permet d'accélérer la mise en contact entre les cellules cibles et la surface fonctionnalisée par rapport aux méthodes macroscopiques, mais les limitations évoquées précédemment restent valables : ces captures peuvent

difficilement être génériques pour un grand nombre d'espèces de pathogènes, et l'élution des cellules cibles après la capture est souvent difficile.

# 3.4.2 Tri en fonction de la taille

Les techniques qui permettent de discriminer les cellules en fonction de leur taille sont nombreuses. Parmi ces méthodes, on peut lister :

- la microfiltration [Ji et al., 2008] (figure 3.7 A), dont le principe global consiste à séparer les cellules en les faisant passer à travers un filtre parallèle ou perpendiculaire à la direction du flux. Le risque très probable de colmatage, déjà évoqué pour les méthodes macroscopiques, reste toujours valable [VanDelinder and Groisman, 2006]. Cela impose souvent une dilution importante de l'échantillon en entrée du microsystème.
- la séparation hydrodynamique, qui tire parti du comportement des cellules au niveau d'un embranchement, tout comme le *Pitch Flow Fractionnation* [Yamada et al., 2004] [Takagi et al., 2005] (figure 3.7 B),
- la formation d'écoulements de Dean dans un système en spirale [Kuntaegowdanahalli et al., 2009]
   [Hou et al., 2013],
- le déplacement latéral déterministe (DLD) [Huang et al., 2004] (figure 3.7 C) dont le principe repose sur un réseau organisé d'obstacles qui dévient latéralement les cellules.



FIGURE 3.7 – D'après [Tsutsui and Ho, 2009] : principe de la microfiltration (A), du Pinch Flow Fractionnation (B) et du DLD (C).

Toutes ces méthodes permettent un tri efficace en fonction de la taille des cellules. Ce critère peut être pertinent pour des cellules dont la taille diffère beaucoup de celles des cellules sanguines, comme pour les CTC par exemple, mais ne permettra pas un tri efficace pour notre problématique. En effet, il existe de grande disparité en taille chez les micro-organismes que nous voulons isoler (de 1 $\mu$ m de diamètre pour les bactéries *S. aureus* à 6 $\mu$ m de diamètre pour les levures *C. albicans*). La taille n'est donc pas un critère assez sélectif. De plus, la taille des plaquettes sanguines, qui sont 10<sup>8</sup> fois plus nombreuses que les pathogènes recherchés, recouvre justement ces dimensions (figure 3.8). Le seul critère de taille n'est donc pas suffisant pour permettre un tri efficace entre les populations cellulaires que nous souhaitons cibler.



FIGURE 3.8 – Distribution en taille de quelques micro-organismes et des différentes cellules du sang.

# 3.5 Méthodes actives

Les méthodes passives présentent des limitations et ne répondent pas complètement à notre problématique. Nous allons donc explorer les méthodes actives, qui reposent sur l'utilisation d'une force externe supplémentaire.

# 3.5.1 Stratégie

Pour discriminer les cellules de façon plus pertinente que par la taille, il est possible de modifier la trajectoire des cellules en appliquant une force extérieure qui dépend des propriétés physiques de la cellule, comme son élasticité, sa susceptibilité magnétique, sa polarisabilité ou encore de ses propriétés optiques. La microfluidique permet d'obtenir des intensités suffisantes pour déplacer les cellules.

Les méthodes qui reposent sur l'utilisation d'une force externe pour trier les cellules peuvent être en général classées selon deux grandes stratégies :

soit les cellules sont soumises à des forces de sens contraire et sont donc déplacées dans un sens opposé. On peut alors soit séparer les particules sur la largeur du canal (figure 3.9 A), soit piéger une population pendant que l'autre est entrainée par l'écoulement (séparation verticale) (figure 3.9 B). Pour trier les cellules, on ne tient pas compte ici de l'intensité de la force, mais uniquement de son sens.



Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

FIGURE 3.9 – Séparation latérale (A) ou séparation verticale (B) en fonction du signe de la force.

- soit les cellules sont toutes déplacées dans le même sens, mais avec une intensité différente. On peut soit séparer les cellules latéralement en fonction de leur position finale sur la largeur du canal après une étape de pré-focalisation (figure 3.9 A), soit séparer les cellules verticalement, avec une force qui s'oppose à la gravité (figure 3.10 B), et la séparation se fait en fonction de la vitesse des cellules dans le profil parabolique (les cellules atteindront la sortie du canal à des temps différents).



FIGURE 3.10 – Séparation latérale (A) ou séparation verticale (B) en fonction de l'intensité de la force.

Différentes forces peuvent être utilisées pour extraire une population cellulaire d'un échantillon complexe. Nous allons principalement nous focaliser sur les forces optiques, magnétiques, électriques et acoustiques.

# 3.5.2 Forces optiques

Les méthodes optiques reposent sur l'utilisation de lasers pour piéger et déplacer des cellules. Elles tirent parti de la pression de radiation, qui est une force exercée par tout rayonnement électromagnétique. Les forces optiques peuvent être utilisées pour manipuler, trier et analyser des particules [Jonas and Zemanek, 2008].

Des objets avec un indice de réfraction différent de celui du milieu extérieur peuvent être attirés au centre d'un faisceau laser [Ashkin, 1970]. En utilisant une lentille pour obtenir un faisceau convergent qui traverse la particule à piéger, il est possible de piéger des particules dans un puits de potentiel [Ashkin et al., 1986] : c'est le principe de la pince optique (figure 3.11 B).

Au départ plutôt utilisé pour la manipulation de cellules uniques, l'utilisation de ces forces peut aussi permettre d'envisager un tri de cellules en continu [MacDonald et al., 2003] en fonction de leur taille et de leur indice de réfraction.



FIGURE 3.11 – (A) principe de la pince optique [Lenshof and Laurell, 2009] et (B) séparation en fonction de l'indice de réfraction des cellules [MacDonald et al., 2003].

La manipulation de cellules en utilisant des forces optiques reste néanmoins une technique complexe, qui requiert un matériel coûteux et imposant.

# 3.5.3 Forces magnétiques

Un champ magnétique non-homogène peut exercer une force sur une particule qui, dans le cas d'une particule sphérique, s'exprime par :

$$\vec{F}_{magn\acute{e}tique} = \frac{2\pi r^3 (\chi_p - \chi_m)}{3\mu_0} \vec{\nabla} |B|^2$$
(3.10)

où *r* est le rayon de la particule (en m),  $\chi_p$  et  $\chi_m$  les susceptibilités magnétiques respectivement de la particule et du milieu (sans dimension),  $\mu_0$  la perméabilité du vide (en T.m.A<sup>-1</sup>) et *B* le champ magnétique (en T).



FIGURE 3.12 – (A) Principe de séparation de particules en utilisant un champ magnétique [Pamme, 2007] et (B) séparation de globules blancs et de globules rouges désoxygénés [Jung and Han, 2008].

Les particules peuvent donc être triées en fonction de leur taille et de leur susceptibilité magnétique relative par rapport à celle du milieu (figure 3.12 A). Les cellules biologiques possèdent pratiquement toutes une susceptibilité magnétique très proche des milieux biologiques comme le plasma, la force magnétique qui en résulte est donc très faible. Pour pallier ce problème, le tri magnétique est généralement précédé d'un marquage spécifique d'une population cellulaire avec des particules magnétiques, ce qui permet d'augmenter l'intensité des forces magnétiques [Pamme and Wilhelm, 2006] [Inglis et al., 2004].

Sans marquage, seuls les globules rouges désoxygénés possèdent une susceptibilité magnétique suffisamment différente de celle d'un milieu biologique pour permettre leur séparation [Furlani, 2007] [Jung and Han, 2008] (figure 3.12 B). C'est le principal inconvénient de cette méthode. Pour notre application, sans marquage, nous ne pourrions donc pas séparer les micro-organismes de l'ensemble des cellules sanguines.

# 3.5.4 Forces électriques

Une particule polarisable, lorsqu'elle est plongée dans un champ électrique non-uniforme, peut être mise en mouvement par diélectrophorèse . De nombreux articles résument les différentes applications de la diélectrophorèse pour la concentration, la séparation et la manipulation de cellules biologiques [Wang et al., 1997] [Pethig, 2010] [Demircan et al., 2013].

La force de DEP qui s'exerce sur une particule sphérique lorsque le champ est stationnaire est donnée par :

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_0 \epsilon_{ext} r^3 Re[f_{CM}] \vec{\nabla} |E|^2$$
(3.11)

où *r* est le rayon de la particule (en m),  $\epsilon_0$  la permittivité du vide (en  $\text{Em}^{-1}$ ),  $\epsilon_{ext}$  la permittivité relative du milieu (sans dimension),  $Re[\underline{f}_{CM}]$  la partie réelle du facteur de Clausius-Mossoti (CM) et *E* le champ électrique (en V.m<sup>-1</sup>).

Le facteur de CM dépend de la fréquence du champ, et des propriétés diélectriques de la particule et du milieu :

$$\underline{f}_{CM} = \frac{\underline{e}_p - \underline{e}_{ext}}{\underline{e}_p + 2\underline{e}_{ext}}$$
(3.12)
$$avec \quad \underline{e}_p = e_p + \frac{\sigma_p}{i\omega\epsilon_0} \quad \text{et} \quad \underline{e}_{ext} = e_{ext} + \frac{\sigma_{ext}}{i\omega\epsilon_0}$$

où  $\epsilon_p$  et  $\epsilon_m$  sont les permittivités relatives respectivement de la particule et du milieu extérieur (sans dimension),  $r_p$  le rayon de la particule (en m), E la valeur efficace du champ électrique (en V.m<sup>-1</sup>),  $\underline{f}_{CM}$  le facteur de Clausius Mossoti (sans dimension),  $\sigma_p$  et  $\sigma_{ext}$  les conductivités respectivement de la particule et du milieu extérieur (en S.m<sup>-1</sup>),  $\omega$  la pulsation du champ électrique (en rad.s<sup>-1</sup>) ( $\omega = 2\pi f$  où f est la fréquence (en Hz)) et j le nombre complexe tel que  $j^2 = -1$ .



FIGURE 3.13 – Exemples de structures pour obtenir un champ électrique non uniforme (les zones où le champ est le plus intense et le moins intense sont respectivement en rouge et en bleu) [Khoshmanesh et al., 2009] : (A) électrodes interdigitées, (B) électodes crénelées (C) électrodes incurvées et (D) piliers isolants.

En général, le gradient de champ électrique est généré par un réseau d'électrodes au fond du canal. De nombreuses structures pour ce réseau ont été décrites dans la littérature, comme des électrodes interdigitées [Li and Bashir, 2002], incurvées[Khoshmanesh et al., 2009] ou encore crénelées [Pethig et al., 1992]. La référence [Khoshmanesh et al., 2010] est une revue très complète des différents réseaux utilisés, dont quelques-uns sont repris figure 3.13.

Le champ non-uniforme peut aussi être généré à travers un ensemble de plots isolants [Cummings and Singh, 2003] [Lapizco-Encinas et al., 2004], qui vont distordre les lignes de champ et donc créer

#### Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

un gradient. Cette stratégie permet par exemple de générer une force suffisamment importante pour la concentration et la séparation de micro-organismes même lorsque les électrodes sont distantes de plus d'1cm [Moncada-Hernandez and Lapizco-Encinas, 2010].

A noter que contrairement à l'électrophorèse, le sens du champ n'intervient pas dans le sens du déplacement de la particule (c'est le gradient de  $E^2$  qui intervient dans le calcul). Le sens de la force dépend uniquement du signe de la partie réelle du facteur de CM. Lorsque la particule est plus polarisable que le milieu, alors  $Re[f_{CM}]$  est positif, et la particule se déplace vers les zones où le champ est le plus intense (on parle de DEP positive ou DEP+). Inversement, lorsque la particule est moins polarisable que le milieu, alors  $Re[f_{CM}]$  est négatif, et la particule se déplace vers les zones où le champ est le plus faible (on parle de DEP négative ou DEP-).



FIGURE 3.14 – (A) Evolution de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] pour une cellule d'une lignée cancéreuse, un érythrocyte et un lymphocyte T ( $\sigma = 56 \text{mS.m}^{-1}$ ) [Becker et al., 1995]. (B) Evolution de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] d'un globule blanc pour différentes conductivités de milieu [Voldman, 2006].

Pour une cellule,  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  évolue en fonction de la fréquence du champ électrique(figure 3.14). A basse fréquence, une cellule biologique peut être modélisée comme un condensateur à cause de sa membrane isolante (la capacité de la membrane plasmique vaut typiquement autour de 1µEcm<sup>-2</sup> [Pethig and Kell, 1987]). Ce sont alors principalement les propriétés de la membrane qui déterminent la valeur de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$ , qui est alors souvent négative, car la cellule apparait moins polarisable que le milieu.

Lorsque la fréquence augmente, la membrane est court-circuitée, le champ pénètre dans le cytoplasme, et ce sont alors principalement les propriétés du cytoplasme et du milieu qui déterminent la valeur de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$ : ce coefficient sera positif dans un milieu faiblement conducteur et négatif dans un milieu très conducteur.

Lorsque cette différence de comportement se traduit par un changement de signe de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$ , la fréquence pour laquelle  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}] = 0$  s'appelle la fréquence de *cross-over*, que nous traduirons ici par fréquence de changement. Elle est différente pour chaque type cellulaire, car elle dépend principale-

ment de la structure et de la composition de la membrane de la cellule. La figure 3.14 A représente l'évolution fréquentielle de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour différentes cellules biologiques, et met en évidence des fréquences de changement différentes. Une méthode classique de séparation binaire consiste à trouver une fréquence du signal électrique entre les deux fréquences de changement des populations à séparer, pour qu'un type cellulaire soit soumis à une force de DEP+ et l'autre à une force de DEP-. Il est possible par exemple de séparer des bactéries Gram+ de bactéries Gram- qui possèdent une structure de leur paroi très différente, avec un champ d'une fréquence de 100kHz [Markx et al., 1994].

Néanmoins lorsque la conductivité du milieu est trop élevée, comme c'est le cas pour les milieux biologiques (la conductivité du sang est de 1.6 S.m<sup>-1</sup>), Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] reste négatif quelle que soit la fréquence (figure 3.14 B). Dans un tel milieu, on ne peut donc plus séparer les cellules en fonction du signe de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ]. Les méthodes de tri reposent alors sur les différences d'intensité de la force, qui dépend en particulier de l'amplitude de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] et de la taille de la cellule. Il est par exemple possible de séparer les globules blancs des globules rouges dans un milieu de même conductivité que le sang [Han and Frazier, 2008] ou de séparer des globules rouges de plaquettes [Piacentini et al., 2011].

La diélectrophorèse est donc une méthode très efficace pour le tri cellulaire sans marquage des cellules, et permet de séparer différentes populations cellulaires en fonction de l'intensité de la force lorsque le milieu est conducteur, et en fonction du signe de la force lorsque le milieu est faiblement conducteur.

#### 3.5.5 Forces acoustiques

On appelle acoustophorèse le fait de mettre en mouvement des particules en utilisant des ondes acoustiques. Lorsque l'onde est stationnaire, la force s'exerçant sur une particule est donnée par :

$$F_{acoustique} = -\left(\frac{2\pi^2 p_0^2 r_p^3 \beta_{\text{ext}}}{3\lambda}\right) \phi(\beta, \rho) \sin(2kx)$$
(3.13)

où  $p_0$  est l'amplitude de l'onde de pression (en Pa), r le rayon de la particule (en m),  $\beta_{\text{ext}}$  et  $\beta_p$  la compressibilité respectivement du milieu extérieur et de la particule (en Pa<sup>-1</sup>),  $\lambda$  la longueur d'onde de l'onde acoustique (en m),  $\phi(\beta, \rho)$  le facteur de contraste acoustique (sans dimension), x la distance entre la particule et le nœud de pression le plus proche (en m) et  $k = 2\pi/\lambda$ .

Le facteur de contraste acoustique est un paramètre qui dépend de la compressibilité et de la densité de la particule et du milieu qui l'entoure. Il s'exprime par :

$$\phi(\beta,\rho) = \frac{5\rho_p - 2\rho_{\text{ext}}}{2\rho_p + \rho_{\text{ext}}} - \frac{\beta_p}{\beta_{\text{ext}}}$$
(3.14)

où  $\rho_{\rm ext}$  et  $\rho_p$  la masse volumique respectivement du milieu extérieur et de la particule (en kg.m<sup>-3</sup>).

En fonction du signe du facteur de contraste (qui dépend à la fois des propriétés physiques du milieu et de celles de la particule), les particules suivront des trajectoires différentes (figure 3.15 A) :

### Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

- si  $\phi(\beta, \rho) > 0$ , les particules seront attirées vers les noeuds de l'onde stationnaire,
- si  $\phi(\beta, \rho) < 0$ , les particules seront attirées vers les ventres de l'onde stationnaire.

Il est donc possible de trier des cellules en fonction de leur élasticité par rapport au milieu extérieur, comme par exemple des globules rouges et de particules lipidiques [Petersson et al., 2004] (figure3.15 B). Néanmoins la plupart des cellules dans les milieux biologiques possèdent un facteur de contraste positif [Hammarstrom et al., 2012]. Pour les discriminer, on peut alors effectuer un tri en jouant sur l'intensité de la force, qui dépend aussi du rayon de la cellule [Petersson et al., 2007].



FIGURE 3.15 – (A) Principe du tri par acoustophorèse [Kayani et al., 2012] et (B) tri de globules rouges et de particules lipidiques par acoustophorèse [Petersson et al., 2004].

L'onde peut être générée à l'aide d'un transducteur piézo-électrique extérieur au canal (figure 3.16 A), et l'onde stationnaire est formée par réflexion sur les parois du canal. Le canal doit alors posséder d'excellentes propriétés de réflexion (comme le silicium ou le verre). Sinon, l'onde stationnaire peut être créée en surface d'un microsystème, à partir d'un substrat piézoélectrique comme le lithium niobate (LiNbO<sub>3</sub>) (figure 3.16 B).



FIGURE 3.16 – Ondes acoustiques générées (A) par un transducteur piézo-électrique [Petersson et al., 2005] et (B) à partir d'un substrat piézoélectrique structuré [Shi et al., 2008].

A l'inverse des méthodes basées sur les forces électriques, la force acoustique ne dépend pas de la conductivité du milieu extérieur. Cette caractéristique est particulièrement intéressante lorsqu'on travaille avec des milieux biologiques.

# 3.5.6 Bilan

Les forces qui s'appliquent sur les cellules sont des forces volumiques, qui dépendent donc de la taille des particules. Les micro-organismes que nous cherchons à séparer peuvent être de taille très variable. Nous allons donc privilégier une discrimination en fonction du signe de la force plutôt qu'en fonction de son intensité.

La diélectrophorèse apparait comme la méthode la plus prometteuse pour cette application. En effet, l'intérêt des microsystèmes prend un sens particulier dans l'utilisation des forces électriques. L'émergence de la microtechnologie et des techniques de microfabrication ont permis de réduire les dimensions des électrodes, et donc de générer des champs localisés plus intenses. Le changement d'échelle apporté par les microsystèmes permet donc de générer des forces beaucoup plus importantes que dans des dispositifs macroscopiques, ce qui a favorisé l'essor de cette méthode pour la manipulation de cellules.

Le principal inconvénient de cette méthode est néanmoins sa forte dépendance avec la conductivité du milieu, qui est importante dans les milieux biologiques. Une diminution de la conductivité de l'échantillon sera donc nécessaire pour exploiter au mieux le potentiel de la DEP comme méthode de tri.

Pour diminuer la conductivité, la solution la plus simple consiste à diluer l'échantillon avec un milieu faiblement conducteur. Cette solution présente les inconvénients majeurs d'augmenter le volume de l'échantillon (donc d'augmenter le temps de traitement de l'échantillon dans le micro-système) et de diminuer la concentration de la population cible. Une méthode alternative à la dilution consisterait à exploiter les forces acoustiques, qui ne dépendent pas de la conductivité du milieu, pour déplacer les cellules vers un fluide moins conducteur que le sang en amont du tri par DEP.

Nous proposons donc d'associer deux méthodes (la diélectrophorèse et l'acoustophorèse) pour mettre au point une méthode de tri en microsystème, qui devra être générique et non létale pour les micro-organismes.

Pour assurer la généricité de la méthode, nous utiliserons un modèle biologique constitué de trois micro-organismes : une bactérie Gram- (*E. coli*), une bactérie Gram+ (*S. epidermidis*) et une levure (*C. albicans*). L'utilisation de ces trois micro-organismes différents permet de couvrir la majorité de la diversité des pathogènes responsables de septicémie. En effet environ 50 % des infections sont dues à des bactéries Gram-, 40% à des gram + et 5% à des levures. Parmi les organismes Gram- et les levures, *E. coli* et *C. albicans* sont les plus représentatifs, et sont responsables de près d'une infection sur deux [Kumar et al., 2006]. Pour les organismes Gram+, c'est *S. aureus* qui est le plus représentatif. Malheureusement, aucune souche de *S. aureus* non pathogène n'était disponible au laboratoire. Nous avons donc utilisé une souche de *S. epidermidis*, dont les cellules ont la même morphologie
#### Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

que celles des souches de S. aureus.

# 3.6 Conclusion : vers l'utilisation de l'acoustophorèse et de la diélectrophorèse

Le tableau 3.3 récapitule les différentes méthodes actives et passives, ainsi que les applications les plus pertinentes recensées dans la littérature.

La microfluidique est une méthode présentée comme prometteuse et ouvre la possibilité d'obtenir des tests rapides, peu chers et automatisés. Si la détection est particulièrement bien développée, les étapes de préparation d'échantillons sont encore peu intégrées, et souvent pratiquées manuellement. Nous présentons donc ici le développement d'un système microfluidique de préparation d'échantillon, qui pourra être intégré en amont d'une méthode de détection.

La taille étant un paramètre trop variable pour être discriminant sur les populations de microorganismes que nous souhaitons cibler, nous avons choisi une approche utilisant l'acoustophorèse et la diélectrophorèse, pour séparer efficacement les micro-organismes des cellules du sang en fonction de leurs propriétés intrinsèques. L'idée générale est d'utiliser ces deux méthodes en série : l'acoustophorèse sera utilisée à partir de l'échantillon brut, dans le but principalement de diminuer la conductivité du milieu biologique contenant les cellules, puis la diélectrophorèse permettra de capturer et concentrer les micro-organismes présents dans l'échantillon.

La DEP fait partie des savoir-faire du laboratoire SATIE/ENS Cachan mais a été peu abordée au LBAM/CEA, et l'acoustophorèse n'avait encore jamais été étudiée dans le laboratoire au démarrage de ces travaux. L'étude et le développement de ces méthodes microfluidiques ont donc permis de démarrer une nouvelle activité dans le laboratoire, avec la mise en place de bancs expérimentaux dédiés, ainsi que la conception et la validation des différents dispositifs dédiés pour le tri cellulaire.

[Davis et al., 2006] [Hou et al., 2013] [Nagrath et al., 2007] [Aran et al., 2011] [Hou et al., 2012] [Hwang et al., 2008] [Jung and Han, 2008] [Yung et al., 2009] [Piacentini et al., 2011] [Han and Frazier, 2008] [Kuczenski et al., 2011] [Petersson et al., 2004] [Adams Tableau 3.3 – Tableau récapitulatif des différentes méthodes de tri et exemples d'applications et al., 2012] [Lenshof and Laurell, 2009]

							[60(
référence	[Davis et al., 2006]	[Aran et al., 2011]	[Hou et al., 2013] [Hou et al., 2012]	[Nagrath et al., 2007] [Hwang et al., 2008]	[Jung and Han, 2008] [Yung et al., 2009]	[Piacentini et al., 2011] [Han and Frazier, 2008] [Kuczenski et al., 2011]	[Petersson et al., 2004] [Adams et al., 2012] [Lenshof and Laurell, 20
efficacité	99% GR - 100% GB	6-22%	85% 80%	50% 50%	89% GB - 94% GR 80%	98% des plaquettes 87 % GR - 92% GB 30%	80% des lipides extraits 95% séparation de 96% des cellules
débit	1µL/h	50µL/min	3mL/h 1mL/h	1mL/h 200µL/min	20µL/h 20mL/h	5µUh 50µUh 75µUh	18mLh 1Lh 5mLh
dilution	sang non dilué	sang non dilué	sang dilué par 2 sang non dilué	sang non dilué sang dilué par 2	dilution par 10 pas de dilution	dilution par 10 dilution par 5 10 <sup>6</sup> cellules/ mL	sang dilué par 15 sang non dilué sang non dilué
application	fractionnement du sang	microfiltration de bactéries dans le sang	séparation de CTC (Dean effect) séparation de bactéries dans le sang	tri de CTC dans le sang tri de bactéries dans le sang	séparation GB / GR séparation levures dans du sang (avec marquage)	séparation globules rouges / plaquettes séparation GP/ GB séparation E coli dans du sang	séparation globules rouges/lipides séparation des GR extraction de plasma
	סרס	microfiltration	forces hydrodynamiques	piliers + anticoprs	m agnéto phorèse	diélect rophorese	acout ophorèse
	ę	səvisst	ed səpoy:	tèm	s	evitos sebor	ltém

Chapitre 3. État de l'art sur les méthodes de décomplexification d'échantillons biologiques

s

# 4 Expériences préliminaires

Ces premières expériences ont pour but d'évaluer expérimentalement le potentiel des forces diélectrophorétiques pour la manipulation et le tri de cellules dans un microsystème. Nous avons pu rapidement faire des expériences préliminaires en utilisant des dispositifs fabriqués dans le cadre d'un autre projet au CEA.

## 4.1 DEP avec un mélange de globules rouges et de levures C. albicans

#### 4.1.1 But et mise en place de l'expérience

Dans ces expériences préliminaires, nous souhaitons étudier le comportement des cellules sanguines et des micro-organismes en présence d'un champ électrique non-uniforme, généré ici par un réseau d'électrodes interdigitées dans le fond de la chambre fluidique. Les micro-systèmes utilisés pour ces expériences seront décrits de manière plus détaillée section 7.3.1.1.

L'échantillon utilisé est constitué d'un mélange de globules rouges et de levures *C. albicans* (annexe A), resuspendus dans une solution isotonique de D-mannitol (280 mM) de faible conductivité (10mS.m<sup>-1</sup>). Après introduction du mélange dans la chambre micro-fluidique, le dispositif est ensuite placé sous un microscope, pour pouvoir enregistrer en temps réel le déplacement des cellules à l'aide d'une caméra. Le réseau d'électrodes interdigitées est ensuite alimenté avec un signal sinusoïdal de fréquence 340 kHz et d'amplitude 10 V<sub>pp</sub>.

### 4.1.2 Description et interprétation de l'expérience

La figure 4.1 illustre le déplacement des globules rouges et des levures *C. albicans* sous l'influence du champ électrique non-uniforme. Dans les toutes premières secondes de l'expérience, les globules rouges et les levures sont tous attirés vers le bord des électrodes : il n'est pas possible de séparer les deux populations. Une fois sur le bord des électrodes, les levures s'immobilisent, alors que les globules rouges se perméabilisent sous l'effet du champ électrique (plus intense sur le bord des électrodes) puis repartent vers le centre des électrodes.



FIGURE 4.1 – Illustration de l'effet de la perméabilisation des globules rouges sous l'effet du champ électrique en fonction du temps : on observe un changement de signe de  $Re[\underline{f}_{CM}]$  suite à une modification des propriétés diélectriques des globules rouges.

La fréquence du signal électrique est toujours la même sur toute la durée de l'expérience (f= 340kHz) : c'est donc bien la perméabilisation des globules rouges sous l'intensité du champ électrique qui permet de les séparer efficacement des levures. Les globules rouges intacts et les globules rouges perméabilisés subissent une force de direction opposée : cette inversion de direction de la force correspond à une inversion du signe de la partie réelle du facteur de CM (équation 3.11). La perméabilisation des cellules eucaryotes permet donc de contrôler le signe de ce facteur, et donne ainsi la possibilité d'orienter les globules rouges dans une direction opposée à celle des levures.

Quant aux micro-organismes, ils semblent eux plus résistants que les cellules sanguines au champ électrique, puisqu'aucun changement de direction n'est observé dans leurs trajectoires. Ils restent immobilisés sur le bord des électrodes pendant toute la durée de l'expérience. Cette différence de sensibilité aux champs électriques permet donc de perméabiliser sélectivement les cellules sanguines et de séparer ainsi les deux populations cellulaires.

#### 4.2 Stratégie en 2 modules

Suite à cette observation, nous souhaitons utiliser cet effet de perméabilisation sélective de la membrane cellulaire pour effectuer un tri binaire entre micro-organismes et cellules sanguines. Cependant, nous préférerons par la suite privilégier une perméabilisation des cellules en diminuant l'osmolarité du milieu plutôt qu'en appliquant un fort champ électrique, pour diminuer l'impact létal que pourrait avoir cette étape de perméabilisation sélective sur les micro-organismes. En effet, même si un changement de signe de  $Re[f_{CM}]$  n'a pas été observé pour les micro-organismes, une exposition à un champ électrique trop intense et/ou pendant une durée prolongée peut avoir des conséquences importantes sur la viabilité des micro-organismes, comme nous le verrons par la suite.

Nous proposons donc une méthode de tri en 2 étapes (figure 4.2) :

- le premier module a pour but de modifier les propriétés du milieu en diminuant sa conductivité (pour permettre un tri binaire par DEP) et son osmolarité (pour perméabiliser sélectivement les cellules sanguines),
- le second module permettra ensuite de séparer et capturer par DEP les micro-organismes en imposant sur les cellules sanguines une force de direction opposée.



FIGURE 4.2 – Stratégie générale en 2 modules, avec une représentation schématique des micro-organismes en vert et des cellules du sang en bleu et gris.

La partie III va détailler l'influence des propriétés du milieu sur le signe de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  pour les microorganismes et les cellules sanguines, et présentera l'intégration de l'étape de modification du milieu en microsystème, alors que la partie IV se focalisera sur la conception du dispositif microfluidique de tri par DEP.

# Module d'échange de milieu : modification du facteur Clausius-Mossoti

Partie III

de

L'objectif de cette partie est de caractériser l'influence des propriétés du milieu extérieur sur le comportement diélectrophorétique des micro-organismes et des cellules sanguines. Le but est de déterminer les conditions expérimentales permettant d'effectuer un tri binaire par DEP entre micro-organismes et cellules sanguines. Nous nous intéressons principalement à l'influence de la conductivité et de l'osmolarité du milieu dans lequel l'ensemble des cellules est en suspension. Une fois ces conditions optimales déterminées (chapitre 5), nous développerons l'intégration de cette étape dans un premier module microfluidique en utilisant les forces acoustiques (chapitre 6).

Le signe de la force de DEP qui s'exerce sur une particule découle du signe de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossoti,  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$ . Ce coefficient dépend des propriétés diélectriques de la cellule, mais aussi de celles du milieu. Dans cette partie, nous allons étudier l'influence de la conductivité du milieu sur le signe de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  pour les cellules sanguines et les micro-organismes, mais aussi l'influence de l'osmolarité du milieu sur les propriétés diélectriques des cellules. Le but sera de déterminer sous quelles conditions il est possible d'effectuer un tri binaire par DEP pour capturer et concentrer les pathogènes dans un échantillon sanguin.

## 5.1 Influence de la conductivité du milieu sur $\operatorname{Re}[f_{CM}]$

On cherche à déterminer à partir de quelle conductivité du milieu il sera possible de capturer et concentrer les micro-organismes en DEP+, et s'il existe une plage de valeurs de fréquence sur laquelle un tri est possible entre les micro-organismes (en DEP+) et les cellules sanguines (en DEP-). Pour cela, il faut être capable de modéliser l'évolution de  $Re[f_{CM}]$  pour chaque type de cellule ciblée.

Il faut donc connaître la fonction qui permet de calculer  $\operatorname{Re}[\underline{f}_{CM}]$  à partir des propriétés d'une cellule et du milieu. Cette fonction est propre à chaque type cellulaire et peut être illustrée par des modèles plus ou moins complets.

Deux critères sont primordiaux pour déterminer la fonction qui permet de calculer  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  à partir des propriétés d'une cellule et du milieu :

- la forme de la cellule (principalement sphérique ou ellipsoïdale),
- et sa structure cellulaire (une unique membrane cytoplasmique ou la présence d'une paroi membranaire supplémentaire, la présence d'un noyau et de structures intracellulaires,...).

#### 5.1.1 Modélisation d'une cellule sanguine : sphère monocouche

Le modèle le plus simple permettant de décrire la morphologie d'une cellule est le modèle sphérique monocouche (figure 5.1). La cellule est alors modélisée par une sphère conductrice (symbolisant le cytoplasme) entourée par une coquille isolante (symbolisant la membrane plasmique). C'est ce modèle que nous utiliserons pour modéliser les cellules sanguines.



FIGURE 5.1 – Modélisation d'une cellule sanguine sous forme d'une sphère monocouche. La cellule est modélisée par une sphère conductrice (symbolisant le cytoplasme) de rayon r entourée par une coquille isolante (symbolisant la membrane plasmique) d'épaisseur  $d_m$ .

Le calcul de  $f_{CM}$  pour une cellule sphérique monocouche est explicité par l'équation 5.1 [Huang et al., 1992].

$$\underline{f}_{CM} = \frac{\underline{\epsilon}_{eq} - \underline{\epsilon}_{ext}}{\underline{\epsilon}_{eq} + 2\underline{\epsilon}_{ext}} \quad \text{où} \quad \underline{\epsilon}_{eq} = \underline{\epsilon}_{m} \frac{(\frac{r}{r-d})^{3} + 2\frac{\underline{\epsilon}_{int} - \underline{\epsilon}_{m}}{\underline{\epsilon}_{int} + 2\underline{\epsilon}_{m}}}{(\frac{r}{r-d})^{3} - \frac{\underline{\epsilon}_{int} - \underline{\epsilon}_{m}}{\underline{\epsilon}_{int} + 2\underline{\epsilon}_{m}}} \tag{5.1}$$

$$\underline{\epsilon}_{int} = \epsilon_{int} - j\frac{\sigma_{int}}{\epsilon_{0}\omega}$$

$$\underline{\epsilon}_{ext} = \epsilon_{ext} - j\frac{\sigma_{ext}}{\epsilon_{0}\omega}$$

$$\underline{\epsilon}_{m} = \epsilon_{m} - j\frac{\sigma_{m}}{\epsilon_{0}\omega}$$

où les indices ext, int et m désignent respectivement le milieu extérieur, le milieu intérieur et la membrane,  $\sigma$  la conductivité (en S.m<sup>-1</sup>),  $\epsilon$  la permittivité relative (sans unité),  $\epsilon_0$  la permittivité du vide (en F.m<sup>-1</sup>), j le nombre complexe tel que  $j^2 = -1$ , r le rayon de la cellule (en m) et d l'épaisseur de la membrane (en m).

A partir des travaux de la littérature qui fournissent des propriétés diélectriques des globules rouges, des globules blancs, et des plaquettes (tableau 5.1), et en utilisant le modèle sphérique monocouche détaillé par l'équation 5.1, nous avons tracé l'évolution théorique de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour chaque souspopulation du sang dans des milieux extracellulaires de différentes conductivités (figure 5.2).

On constate que les trois sous-populations de cellules sanguines possèdent des facteurs de CM très semblables, négatifs quelle que soit la fréquence lorsque la conductivité du milieu extérieur est proche de celle du sang  $(1.6 \text{ S.m}^{-1})$ .

élément	paramètre	globule rouge	globule blanc	plaquette
cellule	rayon r	4μm 70	7.5μm 80	0.9μm 50
cytopiasine	conductivité $\sigma_{int}$	$0.8  \mathrm{S.m^{-1}}$	$0.425 \text{ S.m}^{-1}$	$0.25 \text{ S.m}^{-1}$
membrane cellulaire	permittivité relative $\epsilon_{ m m}$ conductivité $\sigma_{ m m}$ épaisseur d <sub>m</sub>	7.23 0.8 μS.m <sup>-1</sup> 8 nm	6 1 μS.m <sup>-1</sup> 7 nm	6 1 μS.m <sup>-1</sup> 8 nm
	A <b>b</b> <b>b</b> <b>b</b> <b>b</b> <b>b</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>b</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b>	06 1,E+07 1,E+08 1,E+09	1,6 S/m 0,8 S/m 0,16 S/m 0,07 S/m	
	B 0,8 0,6 0,6 0,2 0,2 0,2 0,4 0,6 0,2 0,2 0,2 0,4 0,6 0,2 0,2 0,1,E+04 0,1,E+05 0,1,E+04 0,6 0,6 0,6 0,6 0,6 0,6 0,6 0,6 0,6 0,6	06 1,E+07 1,E+09	1,6 S/m 0,8 S/m 0,16 S/m 0,07 S/m	
	C 0,4 0,3 0,2 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1	00 1.E+07 1.E+08 1	1,6 S/m 0,8 S/m 0,16 S/m 0,07 S/m	

Tableau 5.1 – Propriétés diélectriques d'un globule rouge [Sukhorukov et al., 1998], d'un globule blanc (pour un monocyte) [MacQueen et al., 2008] et d'une plaquette [Egger et al., 1988].

FIGURE 5.2 – Evolution théorique de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] pour un globule rouge, un globule blanc et une plaquette dans des milieux extracellulaires isotoniques de différentes conductivités.

#### 5.1.2 Modélisation d'une levure : sphère double-couche

La même étude peut être faite pour déterminer l'évolution de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour une levure. La modélisation de la cellule est cependant plus complexe, pour prendre en compte la présence supplémentaire d'une paroi cellulaire autour de la membrane (figure 5.3). On parle alors de modèle double couche. D'autres modèles plus complexes, comportant davantage de compartiments peuvent être utilisés dans la littérature, par exemple pour modéliser la présence d'un noyau dans le cytoplasme : on parle alors de modèle multi-couche. Les équations permettant de déterminer  $\underline{f}_{CM}$  pour un modèle sphérique multi-couche sont détaillées dans l'article [Huang et al., 1992]. *A fortiori*, ce modèle peut être utilisé pour le modèle double couche.



FIGURE 5.3 – Modélisation d'une levure sous forme d'une sphère double-couche. La cellule est modélisée par une sphère conductrice (symbolisant le cytoplasme) de rayon r entourée par 2 coquilles isolantes d'épaisseur  $d_m$  et  $d_p$  (symbolisant respectivement la membrane plasmique et la paroi cellulaire).

Le tableau 5.2 récapitule les données diélectriques d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* décrites dans l'article [Braschler et al., 2008]. En utilisant ces données et le modèle sphérique double-couche, on peut donc représenter l'évolution de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  pour une levure en fonction de la fréquence, pour différentes conductivités de milieux extracellulaires (figure 5.4).

élément	paramètre	valeur
cellule	rayon r	4 µm
cytoplasme	permittivité relative $\epsilon_{ m int}$ conductivité $\sigma_{ m int}$	50 300 mS.m <sup>-1</sup>
membrane cellulaire	permittivité relative $\epsilon_{ m m}$ conductivité $\sigma_{ m m}$ épaisseur d <sub>m</sub>	6 250 nS.m <sup>-1</sup> 8 nm
paroi cellulaire	permittivité relative $\epsilon_{\rm p}$ conductivité $\sigma_{\rm p}$ épaisseur d <sub>p</sub>	60 24 mS.m <sup>-1</sup> 220 nm

Tableau 5.2 – propriétés diélectriques d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* [Braschler et al., 2008]

On peut constater une évolution de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  un peu différente par rapport aux cellules sanguines. En effet, l'introduction d'une membrane supplémentaire dans le modèle double couche ajoute



FIGURE 5.4 – Evolution théorique de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  pour une levure sphérique dans des milieux extracellulaires de différentes conductivités.

une interface, et donc une courbure supplémentaire dans l'évolution de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$ . Néanmoins, dans un milieu dont la conductivité est proche de celle du sang (1.6 S.m<sup>-1</sup>),  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  reste négatif sur l'ensemble de la gamme de fréquences, à l'instar des cellules sanguines.

#### 5.1.3 Modélisation d'une bactérie : ellipsoïde double-couche

Pour finir, si l'on souhaite étudier l'évolution du facteur  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour une bactérie *E. coli*, il est nécessaire de modifier à nouveau le modèle puisque la cellule n'est plus sphérique mais ellipsoïdale (figure 5.5). Idéalement, la forme décrite devrait être cylindrique, mais analytiquement, la description d'un ellipsoïde est beaucoup plus aisée. Les équations permettant de déterminer  $\underline{f}_{CM}$  pour un modèle ellipsoïdal double couche sont décrites dans l'annexe A de l'article [Castellarnau et al., 2006].



FIGURE 5.5 – Modélisation d'une bactérie (bacille) sous forme d'un ellipsoïde doublecouche. La cellule est modélisée par un ellipsoïde conducteur (symbolisant le cytoplasme) de demi-grand axe a et de demi-petit-axe b entouré par 2 coquilles isolantes d'épaisseur d<sub>m</sub> et d<sub>p</sub> (symbolisant respectivement la membrane plasmique et la paroi cellulaire).

Le tableau 5.3 récapitule les valeurs des paramètres nécessaires au calcul de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour une bactérie *E. coli* d'après l'article [Suehiro et al., 2003].

En utilisant ces données et le modèle ellipsoïdal double-couche, on peut représenter l'évolution

élément	paramètre	valeur
cellule	demi-grand axe a	1.5 μm
	demi-petit axe b	0.5 μm
cytoplasme	permittivité relative $\epsilon_{\rm int}$ conductivité $\epsilon_{\rm int}$	60 100 mS.m <sup>-1</sup>
membrane cellulaire	permittivité relative $\epsilon_m$ conductivité $\sigma_m$ épaisseur d <sub>m</sub>	10 50 nS.m <sup>-1</sup> 5 nm
paroi cellulaire	permittivité relative $\epsilon_{\rm p}$ conductivité $\sigma_{\rm p}$ épaisseur d <sub>p</sub>	60 500 mS.m <sup>-1</sup> 20 nm

Tableau 5.3 – propriétés diélectriques d'une bactérie E. coli [Suehiro et al., 2003].

de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour une bactérie *E. coli* en fonction de la fréquence, pour différentes conductivités de milieux extracellulaires (figure 5.6).



FIGURE 5.6 – Evolution théorique de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour une bactérie ellipsoïdale dans des milieux extracellulaires de différentes conductivités.

On constate à nouveau que  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  reste négatif sur l'ensemble de la gamme de fréquence, lorsque la conductivité du milieu extérieur est proche de celle du sang.

#### 5.1.4 Bilan

Lorsque la conductivité du milieu extérieur est proche de celle du sang, tous les coefficients  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  sont négatifs (figure 5.7 A). Il est donc impossible de faire une séparation binaire, puisque la force de DEP sera négative sur toutes les cellules, quelle que soit la fréquence.

Il est donc nécessaire de diminuer la conductivité du milieu (jusqu'à atteindre 70 mS.m<sup>-1</sup>, ce qui correspond à une dilution par 20 de l'échantillon sanguin avec de l'eau déionisée) pour que les



FIGURE 5.7 – Evolution de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] pour les cellules sanguines et les micro-organismes dans un milieu de conductivité équivalente à celle du sang (1.6 S.m<sup>-1</sup>) (A) et à celle d'une dilution du sang par 20 avec de l'eau déionisée (70mS.m<sup>-1</sup>) (B).

coefficients  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  deviennent positifs sur une certaine gamme de fréquence (entre 200kHz et 20MHz) (figure 5.7 B).

On peut observer que chaque type cellulaire possède une fréquence de changement spécifique, mais les fréquences de changement des micro-organismes s'intercalent entre celles des cellules sanguines. Il est donc impossible de trouver une fréquence qui permette de faire un tri binaire entre les cellules sanguines et les micro-organismes. Ainsi, une baisse de la conductivité du milieu extérieur n'est pas une modification suffisante pour permettre d'extraire les micro-organismes d'un échantillon de sang par DEP.

Suite aux résultats des expériences préliminaires présentées chapitre 4, nous souhaitons, en plus de la conductivité, diminuer l'osmolarité du milieu, pour modifier sélectivement les propriétés diélectriques des cellules sanguines et ainsi trouver une gamme de fréquence sur laquelle un tri binaire sera possible. L'objectif de la suite du travail est donc de caractériser l'influence d'une baisse de l'osmolarité du milieu sur les propriétés diélectriques des cellules sanguines et des micro-organismes.

#### 5.2 Influence de l'osmolarité du milieu sur une cellule

#### 5.2.1 Généralités

Les membranes des cellules biologiques permettent de délimiter physiquement leurs frontières. Avec des processus de diffusion actifs par le biais de protéines transmembranaires, les membranes biologiques permettent aussi de réguler les concentrations en ions du milieu intracellulaire. Un contrôle précis de ces concentrations est vital pour le fonctionnement optimal de la cellule.

La concentration en solutés d'un milieu permet de déterminer un paramètre physiologique important : l'osmolarité (équation 5.2). Ce paramètre régule principalement le volume des cellules, et un mauvais contrôle de ce paramètre peut avoir de graves conséquences, pouvant mener à la mort d'une cellule.

osmolarité 
$$[mOsm.L^{-1}] = concentration [mmol.L^{-1}] x nb de particules dissociables (5.2)$$

Par exemple, la concentration molaire d'une solution de NaCl 0.85% est égale à 145 mmol.L<sup>-1</sup>, et son osmolarité vaut 145 x 2 (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) = 290 mOsm.L<sup>-1</sup>. L'osmolarité du plasma est d'environ 310 mOsm.L<sup>-1</sup>, principalement due à la présence d'ions chlore et sodium (voir tableau 5.4).

Tableau 5.4 – Liste des principaux ions et de leur concentration dans le plasma [Fischbach and Dunning III, 2009]

ions	concentration extracellulaire (plasma) $[mmol.L^{-1}]$
Na <sup>+</sup>	136-145
Cl-	96-113
$K^+$	3.5-5.2
$PO_4^{3-}$	0.87-1.45
Ca <sup>2+</sup>	2.2-2.6
$Mg^{2+}$	0.74-1.07

Lorsque deux milieux sont séparés par une membrane semi-perméable (laissant entrer librement l'eau mais pas les ions), s'ils n'ont pas la même osmolarité, une pression osmotique va s'exercer sur cette membrane :

$$P_{\rm osm} = R.T.\Delta_{\rm Osm} \tag{5.3}$$

où  $P_{osm}$  est la pression osmotique (en Pa), R la constante universelle des gaz parfaits, T la température (en K) et  $\Delta_{Osm}$  la différence d'osmolarité (mmol.L<sup>-1</sup>) entre les deux milieux.

Cette pression entraînera un mouvement des molécules d'eau du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré, afin d'équilibrer les concentrations en soluté. Ce mouvement d'eau au travers des membranes cellulaires aura un effet sur le volume et la forme des cellules. Si ce volume reste inchangé (aucun mouvement d'eau), le milieu extracellulaire est dit isotonique. C'est le cas de tous les milieux physiologiques du corps humain. Si le volume cellulaire diminue (mouvement d'eau de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule), le milieu est dit hypertonique. Et inversement, si le volume de la cellule augmente (mouvement d'eau de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule), le milieu est qualifié d'hypotonique. Ce changement de volume cellulaire est facilement observable sur des globules rouges, lorsqu'ils sont suspendus dans différents milieux, comme l'illustre la figure 5.8.



FIGURE 5.8 – Evolution de la forme d'un globule rouge en fonction de l'osmolarité du milieu extracellulaire [Alberts et al., 1998].

Un changement d'osmolarité du milieu extracellulaire peut donc permettre de modifier la composition interne d'une cellule, notamment lorsque les variations sont trop brusques pour que les échanges transmembranaires réussissent à conserver les concentrations intracellulaires stables.

Dans la suite de cette partie, nous allons nous intéresser à l'effet d'un milieu hypotonique sur les cellules sanguines et les micro-organismes, pour savoir dans quelle mesure un choc osmotique peut modifier les propriétés diélectriques des cellules et modifier leur comportement en DEP.

#### 5.2.2 Observations expérimentales

#### 5.2.2.1 Effet du choc osmotique sur les globules rouges

Parmi les cellules sanguines, les globules rouges sont les cellules les plus sensibles au choc osmotique. Dans les conditions expérimentales que nous imposons (dilution par 20 avec de l'eau déionisée), la diminution importante et brutale de la concentration ionique extracellulaire provoque un afflux massif d'eau dans les cellules, ce qui provoque la rupture de leur membrane et le relargage du milieu intracellulaire dans le milieu extracellulaire. On observe alors des membranes vides, appelées aussi fantômes cellulaires.

La figure 5.9 présente des globules rouges dans une situation isotonique (image A) et hypotonique (image B). Les globules rouges dans la condition hypotonique ont la même taille que dans la condition isotonique, mais sont vidés de leur contenu. Ils ont très certainement changé de forme, mais l'observation au microscope optique ne nous permet pas de l'affirmer. La forme de larme de certaines des membranes permet même de déterminer le point de rupture de la membrane.



FIGURE 5.9 – Observation au microscope de globules rouges en milieu isotonique (A) et en milieu hypotonique (B). A partir d'un échantillon de sang, la condition isotonique est obtenue par dilution par 20 dans une solution NaCl 0.85%, et la condition hypotonique par dilution par 20 dans de l'eau déionisée.

#### 5.2.2.2 Effet du choc osmotique sur les globules blancs

Contrairement aux globules rouges, le choc osmotique ne provoque pas de relargage du milieu intracellulaire des globules blancs vers le milieu extérieur. Des différences morphologiques sont tout de même observables si on compare un globule blanc dans un milieu isotonique (figure 5.10 A) et un globule blanc dans un milieu hypotonique (figure 5.10 B).

L'augmentation de la taille du noyau (le rayon augmente d'un facteur 3.1) illustre bien la perméabilisation de la membrane des globules blancs dans un milieu hypotonique et l'afflux d'eau dans le milieu intracellulaire.



FIGURE 5.10 – Observation au microscope optique (x20) de globules blancs après marquage du noyau avec une solution d'intercalants SYTO9 (protocole en annexe B), en milieu isotonique (A) et en milieu hypotonique (B). A partir d'un échantillon de sang, la condition isotonique est obtenue par dilution par 20 dans une solution NaCl 0.85%, et la condition hypotonique par dilution par 20 dans de l'eau déionisée. Les images sont obtenues par superposition d'une image de l'échantillon en fond clair et d'une image en fluorescence recolorisée en vert avec ImageJ.

#### 5.2.2.3 Effet du choc osmotique sur les micro-organismes

**Perméabilité membranaire** Pour les micro-organismes, une simple observation au microscope optique ne permet pas d'évaluer les effets de l'osmolarité du milieu sur des cellules aussi petites (aucune altération de la taille ni de la forme n'est visible). Pour mettre ces effets en évidence, nous avons utilisé des intercalants (protocole en annexe B), qui permettent de visualiser la perméabilisation de la membrane des micro-organismes. Lorsque l'intégrité de la membrane est compromise, les deux intercalants utilisés (le SYTO9 et l'iodure de propidium) pénètrent dans la cellule, qui apparaît verte et rouge au microscope en fluorescence. Au contraire, si la membrane est intacte, seul le SYTO9 peut pénétrer à l'intérieur, et la cellule apparaît seulement verte.

La figure 5.11 montre que les deux marqueurs ont pu pénétrer dans les cellules lorsqu'elles sont suspendues dans l'eau déionisée puisqu'à la fois les deux marquages vert et rouge sont observés. Cela signifie que leur membrane est perméabilisée.

Chapitre 5. Changer le milieu pour modifier le comportement diélectrophorétique des cellules



FIGURE 5.11 – Observation au microscope optique (x20) de *C. albicans* et *S. epidermidis* après marquage de la membrane avec une solution d'intercalants (protocole en annexe B), en milieu hypotonique.

**Viabilité** Pour savoir si cette perméabilisation a une influence sur le métabolisme des microorganismes, nous avons voulu quantifier leur viabilité après exposition plus ou moins prolongée à un milieu hypotonique.

La figure 5.12 récapitule les résultats de ce test de viabilité sur les 3 souches de micro-organismes. Les micro-organismes ont été mis en contact pendant un temps déterminé (30 min ou 4h) avec un tampon isotonique (NaCl 0.85%) ou hypotonique (eau déionisée) puis étalés sur boîte pour déterminer le pourcentage de micro-organismes ayant résisté au choc osmotique.

La différence entre le dénombrement dans l'échantillon de départ (qui correspond à 100% de viabilité) et le dénombrement dans les différents milieux à tester représente le nombre de micro-organismes qui n'a pas pu reprendre une croissance détectable au bout de 24h. Ces micro-organismes sont donc considérés comme non viables. <sup>1</sup> Pendant toute la durée de l'expérience, les micro-organismes sont conservés dans la glace, afin d'éviter toute croissance.

Pour les 3 souches testées, la durée d'exposition au tampon hypotonique ne semble avoir aucune

<sup>1.</sup> En microbiologie, la notion de mort cellulaire peut avoir plusieurs définitions, suivant le critère de viabilité que l'on teste (cela peut être une mesure de la croissance, une mesure de l'activité métabolique, un marquage de la perméabilité membranaire,...). Dans toute cette étude, les micro-organismes seront déclarés non viables s'ils n'ont pas pu former de colonies détectables à l'œil nu après 24h à 37°C après étalement sur une boîte d'agar.



FIGURE 5.12 – Quantification de la viabilité de *E. coli* (A), *C. albicans* (B) et *S. epidermidis* (C) après avoir été en contact pendant un temps déterminé (30 min ou 4h) avec un milieu isotonique (NaCl 0.85 %) ou hypotonique (H2O déionisée). Les barres d'erreur correspondent à 3 dénombrements pour chaque condition.

répercussion sur la viabilité. Tout se joue donc dans les premières minutes d'exposition. Pour *E. coli*, lorsque les bactéries sont en contact avec le tampon hypotonique, la viabilité diminue de 20%. Il y a donc bien un effet létal de ce milieu sur les bactéries, même s'il reste beaucoup moins important que pour les cellules sanguines. Pour *C. albicans*, l'osmolarité du milieu n'a aucune influence sur la viabilité. Le dénombrement des cellules dans le milieu isotonique est le même que dans le milieu hypotonique, avec une baisse du nombre de micro-organismes de 20% par rapport à l'échantillon de départ. On peut donc en conclure que ces micro-organismes, une fois séparés de leur milieu nutritif, commencent à mourir en l'absence de nutriment, sans que l'osmolarité du milieu n'ait une

quelconque influence. Pour *S. epidermidis*, l'expérience est plus difficile à interpréter. En effet, le dénombrement des micro-organismes est beaucoup plus faible dans les échantillons isotoniques NaCl que dans l'échantillon de départ. Ce micro-organisme est connu pour s'adsorber très facilement aux surfaces [Weaver et al., 2012]. Il est donc difficile de savoir si cette différence provient de la mort effective des micro-organismes ou si le nombre de micro-organismes que l'on récupère diminue à cause de cette adsorption non-spécifique. De plus, l'absorption dépend fortement du tampon utilisé : il est donc très difficile de comparer des dénombrements effectués dans deux tampons différents. Cet artefact nous empêche de donc de conclure pour cette espèce.

#### 5.2.3 Bilan

Ces observations permettent de mettre en évidence l'influence du milieu extérieur sur l'intégrité membranaire et la viabilité des cellules. Le choc osmotique, à l'instar de la lyse par choc électrique, permet une modification brutale et irréversible des membranes des cellules du sang. Les microorganismes possèdent une structure cellulaire différente des cellules sanguines, ce qui leur permet de mieux résister à une différence d'osmolarité entre le milieu extracellulaire et leur cytoplasme.

En particulier, cela permet de conjecturer la possibilité de manipuler sélectivement la valeur du facteur de CM des cellules sanguines en jouant sur l'osmolarité du milieu, tout en gardant une part significative (au moins 80%) des micro-organismes viables.

La suite de notre travail consiste à approfondir ces observations pour déterminer l'influence de la diminution de l'osmolarité sur les propriétés diélectriques des cellules.

# 5.3 Caractérisation des propriétés diélectriques des cellules par électrorotation

#### 5.3.1 Caractérisation théorique

Dans nos conditions expérimentales, l'altération de la membrane cellulaire est suffisamment importante pour modifier les propriétés diélectriques des cellules, entrainant une modification de la valeur du facteur de CM. Expérimentalement, cela se traduit par un changement de direction des forces de DEP auxquelles les cellules sont soumises lorsqu'elles sont plongées dans un champ électrique non-uniforme (voir chapitre 4). Cette section détaille donc la caractérisation des propriétés diélectriques des cellules biologiques dans des milieux isotonique et hypotonique, en utilisant la technique d'électro-rotation.

#### 5.3.1.1 Etat de l'art et démarche scientifique

L'électro-rotation est un phénomène couramment utilisé pour caractériser des cellules. Cette technique permet par exemple de différencier les grandes familles de globules blancs [Yang et al., 1999] ou de détecter la présence de la malaria dans des globules rouges [Gascoyne et al., 1997]. Elle repose sur l'analyse de la vitesse de rotation des cellules sous l'effet d'un champ électrique.

Les cellules sont mises en rotation à l'aide d'un champ électrique tournant, qui peut être obtenu par un réseau de 4 électrodes, sur lesquelles on applique des tensions déphasées de 90° (figure 5.13). Le champ et le moment dipolaire induit sont déphasés, ce qui impose un couple sur la cellule qui entre alors en rotation.



FIGURE 5.13 – Schéma de principe du couple qui s'exerce sur une particule polarisable dans un champ tournant généré par un réseau de 4 électrodes déphasées de 90°[Hughes, 2000].

La particule subit un couple  $\Gamma(f)$  :

$$\Gamma(f) = -4\pi r^3 \epsilon_0 \epsilon_{\text{ext}} Im[f_{CM}] E_0^2$$
(5.4)

où *r* est le rayon de la particule (en m),  $\epsilon_0$  la permittivité du vide (en F.m<sup>-1</sup>),  $\epsilon_{\text{ext}}$  la permittivité relative du milieu extérieur (sans dimension),  $Im[\underline{f}_{CM}]$  la partie imaginaire du facteur de CM, et  $E_0$  l'amplitude du champ électrique (en V).

Le sens de rotation de la particule dépendra donc du signe de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$ : s'il est négatif, la particule tournera dans le même sens que le champ. A l'inverse, s'il est positif, la particule tournera dans le sens contraire.

L'équation 5.5 [Arnold and Zimmermann, 1988] permet d'exprimer la vitesse et le sens de rotation de la particule en fonction des paramètres expérimentaux (la viscosité du milieu  $\eta$  et l'amplitude du champ  $E_0$ ) et des propriétés de la cellule (à travers Im[ $\underline{f}_{CM}$ ]).

$$\Omega(f) = -K.Im[\underline{f}_{CM}] \quad \text{où} \quad K = \frac{\epsilon_{ext}E_0^2}{2\eta}$$
(5.5)

La détermination de la vitesse de rotation pour différentes fréquences (on parle de spectre de rotation) permet de déterminer l'évolution de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$ , puis de remonter aux caractéristiques diélectriques de la particule.

La figure 5.14 représente un spectre d'électro-rotation typique pour une cellule vivante. Trois valeurs sont caractéristiques d'un spectre d'électro-rotation : les deux pics pour lesquels la rotation atteint une valeur maximale (l'un dans le sens du champ, l'autre dans le sens contraire), et la fréquence à laquelle le sens de rotation de la cellule s'inverse. Comme discuté précédemment section 3.5.4, la structure et la composition de la membrane influencent plutôt le comportement de la cellule aux basses fréquences (donc sont déterminants essentiellement pour la valeur du pic d'anti-rotation), et les paramètres du cytoplasme influencent davantage son comportement aux plus hautes fréquences (donc principalement sur le pic de rotation).



FIGURE 5.14 – spectre 'typique' d'électro-rotation d'une cellule vivante.

La vitesse de rotation étant proportionnelle au coefficient  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  (équation 5.5), il est facile d'obtenir l'évolution de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  à partir d'un spectre d'électro-rotation. L'évolution du coefficient  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  est fortement corrélée à l'évolution du coefficient  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$ , puisqu'ils dépendent tous les deux des propriétés diélectriques de la cellule. Si l'on arrive à déterminer les propriétés diélectriques de la cellule à partir de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$ , on pourra alors calculer  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$ . Comme l'illustre la figure 5.15 qui représente l'évolution typique des coefficients  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  et  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  pour une cellule vivante, le maximum de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  est atteint lorsque  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  passe par 0 : c'est principalement ce paramètre, la valeur de la fréquence pour laquelle le signe de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  s'inverse, qui nous intéresse.

La partie précédente a détaillé les différents modèles cellulaires pouvant être utilisés pour déterminer le facteur  $\underline{f}_{CM}$  (donc Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] et Im[ $\underline{f}_{CM}$ ]) à partir des propriétés diélectriques des cellules. On cherche ici à faire le contraire, c'est-à-dire à extraire les propriétés diélectriques de la cellule en déterminant expérimentalement l'évolution de Im[ $\underline{f}_{CM}$ ], en choisissant le modèle cellulaire adapté.

Avant de passer à la partie expérimentale, on peut se demander si la perméabilisation d'une membrane cellulaire peut effectivement être détectable à partir d'un spectre d'électro-rotation. Puisque l'on s'attend à une modification de la taille de la cellule et de la conductivité du cytoplasme et/ou de la membrane, nous allons déterminer théoriquement l'influence de ces paramètres sur l'évolution de  $Im[\underline{f}_{CM}]$ .



FIGURE 5.15 – Evolution typique de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  et  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  pour une cellule vivante.

#### 5.3.1.2 Influence des paramètres de la cellule

Pour cette étude, nous ne considérerons que le modèle sphérique simple couche. Cette première approche est un peu restrictive pour les autres modèles (levures et bactéries), mais la présence d'une seconde couche autour de la cellule et la forme non-sphérique nécessiteraient des développements supplémentaires pour mieux comprendre l'influence de tous les paramètres.

Comme détaillé précédemment, à basse fréquence ce sont principalement les propriétés électriques de la membrane de la cellule qui vont avoir un rôle prépondérant, alors que les propriétés du cytoplasme auront une influence plutôt à haute fréquence. On peut donc s'attendre à ce qu'une altération de la membrane ait principalement une influence sur le premier pic de  $\text{Im}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  (qui correspond au pic d'anti-rotation), et qu'à l'inverse, une modification du cytoplasme ait une influence plutôt sur le deuxième pic de  $\text{Im}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  (qui correspond au pic d'anti-rotation).

**Conductivité de la membrane** La figure 5.16 représente l'évolution de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  lorsque la conductivité de la membrane d'un globule rouge augmente. C'est précisément ce paramètre qui évolue le plus lorsqu'une cellule est immergée dans un milieu hypotonique, pouvant augmenter jusqu'à un facteur 10<sup>4</sup> [Pethig and Markx, 1997].

Conformément à ce qui avait été conjecturé plus haut, le deuxième pic reste inchangé quelle que soit la valeur de la conductivité de la membrane, mais l'amplitude du premier pic diminue d'un facteur 6 lorsque la conductivité augmente. De plus, on peut observer une translation du maximum de ce pic vers les plus hautes fréquences.



 $\label{eq:FIGURE 5.16-Evolution théorique de Im[\underline{f}_{CM}] \ pour un globule rouge lorsque l'on modifie la conductivité de la membrane.$ 

**Conductivité du cytoplasme** Dans un milieu hypotonique, lorsque de l'eau pénètre à l'intérieur de la cellule, le cytoplasme change de composition et donc de propriétés diélectriques. Ces changements seront alors observables sur le coefficient  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  de la cellule gonflée ou lysée.

La figure 5.17 représente la modification théorique de  $\text{Im}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour un globule rouge dont la conductivité du cytoplasme diminue (simulant une dilution du cytoplasme par une arrivée de molécules d'eau à l'intérieur de la cellule). Une modification de la conductivité du cytoplasme modifie entièrement  $\text{Im}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  sur toute la gamme de fréquence, en modifiant à la fois l'amplitude et la position des maxima des 2 pics. Plus la valeur de la conductivité se rapproche de celle du milieu extérieur, plus la vitesse de rotation diminue, car la différence de polarisabilité entre la cellule et le milieu s'atténue.



FIGURE 5.17 – Evolution théorique de Im $[\underline{f}_{CM}]$  pour un globule rouge lorsque l'on modifie la conductivité du cytoplasme.

**Taille de la cellule**En milieu hypotonique, le volume de la cellule va augmenter, à cause de l'entréemassive d'eau au travers de la membrane. La taille est un des paramètres qui permet de calculer  $\underline{f}_{CM}$ ,ce paramètre aura donc une influence sur le spectre d'électro-rotation d'une cellule. La figure 5.18représente l'évoultion de Im $[\underline{f}_{CM}]$  pour différentes tailles de cellules : une augmentation de la taillede la cellule aura pour conséquence de décaler le pic d'anti-rotation vers les plus hautes fréquences.



FIGURE 5.18 – Evolution théorique de  $Im[f_{CM}]$  lorsque l'on modifie la taille de la cellule.

#### 5.3.1.3 Conclusion

La comparaison des spectres d'électro-rotation d'une cellule dans un milieu hypotonique et dans un milieu isotonique nous permettra donc de comprendre l'effet d'un choc osmotique sur les propriétés diélectriques des cellules, et d'extraire ces paramètres.

#### 5.3.2 Caractérisation expérimentale

Nous avons mis en application les calculs de la section précédente en effectuant des expériences d'électro-rotation sur des cellules sanguines et des bactéries dans des milieux de différentes osmolarités, afin d'observer une variation de leurs spectres d'électro-rotation. Cette étude permettra de comprendre quels paramètres diélectriques sont modifiés lorsque le milieu extérieur devient hypotonique, et de déterminer la valeur de ces paramètres, pour au final déterminer quelle sera l'influence de l'osmolarité du milieu sur la force de DEP.

#### 5.3.2.1 Préparation des échantillons

Des globules rouges et des bactéries *E. coli* ont été utilisés pour ces expériences. Pour chaque type cellulaire, deux milieux différents sont testés (la composition des milieux est détaillée tableau 5.5) :

- un milieu isotonique, avec une conductivité de 70 mS.m<sup>-1</sup>
- un milieu hypotonique, avec une conductivité de 70 mS.m<sup>-1</sup>

Tableau 5.5 – Composition des différents milieux utilisés pour les expériences d'électrorotation

type cellulaire	milieu isotonique (70 mS.m <sup>-1</sup> )	milieu hypotonique (70 mS.m <sup>-1</sup> )
bactérie <i>E. coli</i>	milieu LB dilué 20x avec une solution de sucrose 290mmol.L <sup>-1</sup>	milieu LB dilué 20x avec de l'eau déionisée
globule rouge	sang dilué 20x avec une solution de sucrose 290mmol.L <sup>–1</sup>	sang dilué 20x avec de l'eau déionisée

Pour pouvoir comparer uniquement l'influence de l'osmolarité sur le spectre d'électro-rotation, il est important d'utiliser des milieux de même conductivité. En effet, comme montré précédemment, la conductivité du milieu extérieur modifie fortement le coefficient  $\underline{f}_{CM}$ , donc le spectre d'électro-rotation des cellules.

#### 5.3.2.2 Description du banc expérimental

La mise en œuvre du banc expérimental et l'analyse du spectre d'électro-rotation a fait l'objet d'une étude spécifique au laboratoire SATIE de l'ENS de Cachan dans le cadre d'un stage M2R [Trainito, 2012]. Les microsystèmes dédiés ont été fabriqués dans les salles blanches de l'ENS Cachan sur des substrats en quartz.

Ce banc fait appel à 4 générateurs synchronisés et pilotés sous Labview, qui aliment un réseau de 4 électrodes, avec des signaux sinusoïdaux de même fréquence et de même amplitude, mais déphasés chacun de 90° (figure 5.19 A).



FIGURE 5.19 – Montage expérimental pour les mesures d'électro-rotation : (A) disposition des électrodes et des signaux électriques et (B) banc expérimental pour les expériences d'électro-rotation.

Les électrodes sont de forme polynomiale [Huang and Pethig, 1991] afin d'avoir un champ uniforme au centre du réseau (figure 5.20), et sont espacées de  $30\mu$ m lors des expériences avec les bactéries, et 75µm avec les globules rouges. Puisque la vitesse de rotation de la cellule dépend de  $E^2$ , il est en effet essentiel que le champ soit le plus uniforme possible entre les électrodes, afin que ce paramètre reste constant durant toute l'expérience même si la cellule se déplace un peu entre les électrodes.



FIGURE 5.20 – Répartition du champ électrique dans un système d'électrodes polynomiales [Frénéa-Robin et al., 2009].

Une goutte de suspension cellulaire est déposée sur le réseau d'électrodes, puis recouverte par une lamelle. Le réseau est ensuite connecté aux 4 signaux sinusoïdaux puis placé sous un microscope pour l'observation de la rotation des cellules (figure 5.19 B). L'ensemble est associé à une caméra rapide (Phantom 9.1 Bision Research AMTEK) adaptée à un microscope pour la prise d'images.

La caméra a été utilisé à une cadence de 50 images/s et 200 images/s pour enregistrer respectivement la rotation des globules rouges (qui ne dépassait pas quelques tr/s) et la rotation des bactéries *E. coli* (qui pouvait être supérieure à 10 tr/s).

L'exploitation des vidéos se fait de la manière suivante : après avoir sélectionné une cellule, on mesure sa vitesse de rotation en déterminant le nombre de tours que va faire la cellule en un temps donné. En répétant cette opération sur une gamme de fréquence du signal électrique entre 50kHz et 30MHz, il est alors possible de reconstruire le spectre d'électro-rotation de la cellule.

La suite de l'exploitation des résultats consiste ensuite à déterminer les valeurs des paramètres de la cellule afin de se rapprocher au mieux du spectre de rotation expérimental, en utilisant une méthode de régression comme la méthode des moindres carrés par exemple.

#### 5.3.2.3 Critère d'acceptabilité

Pour que l'acquisition d'un spectre d'électro-rotation soit correcte, la cellule étudiée doit répondre à certains critères :

- la cellule ne doit pas être trop proche d'une autre cellule environnante, afin de pouvoir négliger

toute force d'interaction entre deux cellules,

- la cellule doit se trouver dans une zone où le champ est homogène pendant toute la durée de l'expérience, et ne doit donc pas trop se rapprocher des électrodes,
- la cellule doit rester dans la zone de prise d'images tout au long de l'expérience (nous verrons plus loin que ce critère est difficile à respecter en pratique dans le cas des bactéries *E. coli* qui sont motiles).

#### 5.3.2.4 Obtention des spectres

**Spectre de globule rouge en milieu isotonique** La figure 5.21 A montre un globule rouge dans un champ électrique tournant observé au microscope. Le milieu extérieur est ici un milieu isotonique avec une conductivité de  $70 \text{mS.m}^{-1}$ .



FIGURE 5.21 – (A) Expérience d'électro-rotation d'un globule rouge en condition isotonique sur le dispositif d'électro-rotation. (B) Evolution de sa vitesse de rotation en fonction de la fréquence.

Après avoir mesuré sa vitesse de rotation sur une large gamme de fréquence (entre 100kHz et 30MHz), on peut représenter son spectre d'électro-rotation (figure 5.21.B). Les pics d'anti-rotation et de

rotation sont bien marqués, avec une inversion du sens de rotation un peu avant 10MHz.

**Spectre de globule rouge en milieu hypotonique** La même expérience a été réalisée en suivant un globule rouge dans un milieu hypotonique. La figure 5.22 A montre un globule rouge dans le microsystème d'électro-rotation : les globules rouges sont perméabilisés, l'intérieur des cellules est translucide et on ne peut distinguer que très faiblement la membrane des cellules. De même qu'avec le milieu isotonique, il est possible de faire tourner cette cellule sur une large gamme de fréquence pour obtenir son spectre d'électro-rotation (figure 5.22.B).



FIGURE 5.22 – (A) Expérience d'électro-rotation d'un globule rouge en condition hypotonique sur le dispositif d'électro-rotation. (B) Evolution de sa vitesse de rotation en fonction de la fréquence.

Dans le milieu hypotonique, le spectre d'électro-rotation ne présente plus de pic de rotation, mais seulement un unique pic d'anti-rotation, plus évasé que dans le cas du milieu isotonique. Les observations au microscope et ces changements qualitatifs montrent bien que l'osmolarité du milieu a modifié les propriétés diélectriques des globules. Une analyse quantitative de ces changements sera explicitée section 5.3.2.5.

**Spectres de bactéries** Les bactéries *E. coli* sont motiles, et peuvent donc se déplacer même lorsqu'elles sont immobilisées entre lame et lamelle : il n'a pas été possible de garder une même bactérie immobile au centre des électrodes pendant toute la durée d'une expérience. Nous avons donc réalisé des vidéos pour chaque fréquence étudiée, mais pour des bactéries distinctes. Il n'est donc possible de tracer un spectre correspondant à une unique bactérie. La figure 5.23 représente donc des spectres d'électro-rotation dont chaque point expérimental est en réalité la moyenne des vitesses de rotation de l'ensemble des bactéries exploitables sur la vidéo. Les barres d'erreur représentent les écarts types entre toutes ces mesures pour chaque condition testée. La variabilité inter-cellulaire est suffisamment faible pour que l'on puisse observer des vitesses moyennes différentes pour chaque condition. Quelle que soit la fréquence, les bactéries tournent uniquement dans le sens inverse du champ électrique, et seul le pic d'anti-rotation est visible, à la fois pour les conditions isotoniques et hypotoniques (figure 5.23).

Pour pallier ce problème de motilité et réussir à obtenir un spectre pour une seule bactérie, il est envisagé de coupler les deux phénomènes de DEP et d'électro-rotation, afin de capturer une bactérie au centre des électrodes par DEP et simultanément la faire tourner par électro-rotation. Ce travail est en cours de développement au sein du laboratoire SATIE.



FIGURE 5.23 – (A) Expérience d'électro-rotation d'une bactérie *E. coli* sur le dispositif d'électro-rotation et évolution de la vitesse de rotation d'un groupe de bactéries en milieu isotonique (B) et hypotonique (C).

#### 5.3.2.5 Détermination des paramètres

Après avoir détaillé l'acquisition des spectres d'électro-rotation, nous allons maintenant nous intéresser à l'extraction des paramètres. La première étape est de déterminer l'évolution de  $\text{Im}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  à partir du spectre, puis une deuxième étape permet d'extraire les paramètres par minimisation de l'écart entre courbe théorique et mesure expérimentale.

**Lien entre du spectre d'électro-rotation et**  $\operatorname{Im}[\underline{f}_{CM}]$  **: détermination du facteur K** Une fois les spectres d'électro-rotation obtenus, il suffit de connaitre les conditions expérimentales qui permettent de calculer le facteur K (équation 5.5) pour en déduire  $\operatorname{Im}[\underline{f}_{CM}]$ . Ce coefficient K dépend de la valeur du champ dans le système d'électro-rotation, donc de la distance entre les électrodes et de l'amplitude du signal électrique. Il dépend aussi de la viscosité du milieu. Le tableau 5.6 résume les conditions expérimentales utilisées pour le calcul du facteur K pour analyser la rotation des bactéries et des globules rouges.

Tableau 5.6 – Conditions expérimentales utilisées pour le calcul du facteur K pour analyser la rotation des bactéries et des globules rouges.

	bactérie	globule rouge	globule rouge lysé
distance entre les électrodes	30 µm	75 μm	75 µm
amplitude du signal	1 V	1V	5 V
viscosité dynamique du milieu permittivité relative du milieu	1 10 <sup>-3</sup> Pa.s 80	3.5 10 <sup>-3</sup> Pa.s 80	3.5 10 <sup>-3</sup> Pa.s 80
valeur de K (u S.I.)	393	18	450

La viscosité de l'échantillon sanguin ayant servi pour les expériences d'électro-rotation des globules rouges n'a pas été déterminée expérimentalement, mais la valeur de  $3.5 \ 10^{-3}$  Pa.s a été estimée à partir des spectres, afin que l'ajustement soit le meilleur possible. Bien que dilué par 20, on retrouve une viscosité du même ordre de grandeur que celle du sang (6.7  $10^{-3}$  Pa.s [Lowe et al., 1980]).

 $Im[\underline{f}_{CM}]$  et paramètres diélectriques pour les globules rouges Afin de déterminer les paramètres diélectriques des globules rouges de notre échantillon, le modèle sphérique mono-couche a été utilisé. Pour les 2 conditions isotonique et hypotonique, ce modèle a permis d'ajuster les paramètres diélectriques des cellules pour que l'évolution des points expérimentaux puisse être décrite par la courbe théorique. Les figures 5.24 A et 5.25 A illustrent la superposition des courbes théoriques ajustées et des spectres d'électro-rotation. Le tableau 5.7 résume les paramètres diélectriques ajustés à partir des spectres d'électro-rotation.

Tableau 5.7 – Propriétés diélectriques d'un globule rouge déterminées d'après les spectres d'électro-rotation (propriétés du milieu extérieur :  $\sigma_m = 70 \text{ mS.m}^{-1}$  et  $\epsilon_m = 80$ ).

élément	paramètre	milieu isotonique	milieu hypotonique
cellule	rayon	4 μm	4 μm
cytoplasme	permittivité relative	70	80
	conductivité	1.2 S.m <sup>-1</sup>	72 mS.m <sup>-1</sup>
membrane cellulaire	permittivité relative	7.5	11
	conductivité	0.8 $\mu$ S.m <sup>-1</sup>	0.52 mS.m <sup>-1</sup>
	épaisseur	8 nm	8 nm

Les paramètres extraits pour les globules rouges non lysés sont très cohérents avec ce que l'on peut trouver dans la littérature (voir tableau 5.1). On constate alors que le milieu intérieur des globules



FIGURE 5.24 – Electro-rotation d'un globule rouge en condition isotonique : (A) évolution de Im[ $\underline{f}_{CM}$ ] et ajustement entre théorie et expériences et (B) évolution de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] à partir des propriétés diélectriques déterminées par les mesures d'électro-rotation.



FIGURE 5.25 – Electro-rotation d'un globule rouge en condition hypotonique : (A) évolution de  $\text{Im}[\underline{f}_{CM}]$  et ajustement entre théorie et expériences et (B) évolution de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  à partir des propriétés diélectriques déterminées par les mesures d'électro-rotation.

rouges perméabilisés possède pratiquement les mêmes paramètres que ceux du milieu extérieur, et que la conductivité de la membrane a augmenté quasiment d'un facteur 10<sup>3</sup>. Ces résultats sont bien en adéquation avec ce qui est rapporté par la littérature [Pethig and Markx, 1997].

Ces estimations permettent de tracer le facteur  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  pour chacune de ces conditions (figures 5.24 B et 5.25 B), et d'en déduire l'influence de l'osmolarité du milieu sur l'intensité et la direction de forces de DEP qui s'appliquent sur ces cellules. Alors que  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  devient positif à partir de 400 kHz en milieu isotonique, il reste négatif quelle que soit la fréquence lorsqu'on perméabilise la membrane
de la cellule en diminuant l'osmolarité.

Im [ $\underline{f}_{CM}$ ] **et paramètres diélectriques pour les bactéries** Il n'a donc pas encore été possible d'extraire les propriétés diélectriques des bactéries *E. coli* à l'aide du modèle ellipsoïdale double couche (travail en cours). L'influence de l'osmolarité du milieu sur les propriétés diélectriques des bactéries n'a pas encore été caractérisée, même si les tests de viabilité laissent penser que le métabolisme des micro-organismes est très peu sensible à l'osmolarité. De plus, la littérature ne fait pas état de changement de propriétés diélectriques chez les micro-organismes lorsque l'osmolarité du milieu extérieur change. En effet, beaucoup d'équipes travaillant sur l'électro-rotation des micro-organismes ne prennent pas le soin d'équilibrer l'osmolarité du milieu pour leurs expériences, et n'ont jamais discuté ce point ([Hölzel, 1999] [Hölzel, 1997]. Nous prendrons donc les mêmes valeurs issues de la littérature lorsque nous aurons besoin de connaître les paramètres diélectriques des micro-organismes dans un milieu hypotonique ou isotonique.

# 5.4 Bilan : propriétés du milieu pour permettre une capture des microorganismes par DEP+

# 5.4.1 Détermination des propriétés optimales

Après avoir quantifié l'influence de l'osmolarité du milieu sur les propriétés des globules rouges, il est maintenant possible de prévoir l'évolution de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  pour des conditions d'osmolarité différentes et donc d'en déduire l'intensité et la direction de la force de DEP pour ces cellules dans différents milieux. Pour les micro-organismes, nous utiliserons les données de la littérature et les modélisations des différentes structures détaillées plus haut, et pour les globules rouges, les valeurs expérimentales du tableau 5.7.

Nous nous intéressons précisément à 3 milieux différents :

- le plasma, milieu isotonique et conducteur, dans lequel seule une force de DEP- est envisageable, quelle que soit la fréquence, et quel que soit le type de cellules (figure 5.26 A),
- un milieu isotonique de conductivité 70mS.m<sup>-1</sup> : cette diminution de conductivité est nécessaire pour permettre de capturer des cellules en DEP+ (figure 5.26 B),
- un milieu hypotonique de conductivité 70mS.m<sup>-1</sup>, pour perméabiliser les cellules sanguines et modifier ainsi sélectivement leurs propriétés diélectriques ((figure 5.26 C).

Alors qu'à elle seule une diminution de la conductivité de l'échantillon n'est pas suffisante pour séparer les micro-organismes des globules rouges par DEP, une diminution conjointe de l'osmolarité permet de perméabiliser sélectivement les globules rouges, et rend possible la capture générique de *E. coli* et *C. albicans* par DEP+ sur une large gamme de fréquence (entre 1 et 20MHz). Les globules rouges subiront alors une force de DEP négative ou nulle.

Toutefois, l'étude de l'influence de l'osmolarité sur les propriétés diélectriques des cellules sanguines



FIGURE 5.26 – Evolution de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] pour une bactérie, une levure et un globule rouge dans un milieu isotonique de conductivité 1.6S. m<sup>-1</sup> (A), dans un milieu isotonique de conductivité 70 mS.m<sup>-1</sup> (B) et dans un milieu hypotonique de conductivité 70 mS.m<sup>-1</sup> (C). La flèche rouge indique la plage de fréquence sur laquelle un tri binaire entre cellules sanguines et micro-organismes est possible.

a pour l'instant été menée uniquement sur des globules rouges. Il faudrait envisager d'effectuer la même étude sur les globules blancs et les plaquettes. Dans la suite, nous observerons expérimentalement que leurs comportements sont semblables à ceux des globules rouges.

#### 5.4.2 Obtention des propriétés optimales

Une dilution de l'échantillon d'un facteur 20 avec de l'eau déionisée permet de répondre aux critères de diminution de conductivité (pour attendre 70 mS.  $m^{-1}$ ) et d'osmolarité. Ces conditions permettront donc ensuite d'effectuer un tri efficace par DEP entre micro-organismes et cellules sanguines. Néanmoins la dilution de l'échantillon n'est pas une solution optimale, puisque le volume de l'échantillon a traité est alors multiplié par 20. Le prochain chapitre détaille l'intégration en microsystème d'une solution pour modifier le milieu environnant des cellules sans diluer l'échantillon, en utilisant les forces acoustiques permettant un échange de milieu.

# 6 Optimisation du module d'échange de milieu : l'acoustophorèse

Comme discuté précédemment, une diminution de la conductivité et de l'osmolarité du milieu extérieur est nécessaire pour se placer dans des conditions favorables pour effectuer un tri binaire par DEP. On peut ainsi perméabiliser sélectivement les cellules sanguines et capturer les microorganismes par DEP+. Ce changement de propriétés peut être obtenu par une dilution par 20 de l'échantillon de sang avec de l'eau déionisée. Cependant cette solution augmente fortement le volume d'échantillon à traiter en entrée du module de DEP. Nous allons donc étudier une méthode alternative pour modifier le milieu dans lequel sont suspendues les cellules, en utilisant les forces acoustiques.

Cette partie restitue le début des travaux sur les forces acoustiques, notamment la mise en place du banc expérimental et les expériences préliminaires. Faute de temps, ces travaux n'ont pas pu être menés à terme, mais sont en train d'être approfondis au laboratoire LBAM/CEA.

# 6.1 Rappels théoriques

# 6.1.1 Principe général

Les travaux de l'équipe de Laurell fournissent des exemples d'utilisation de la force acoustique pour déplacer des particules dans des microsystèmes [Laurell et al., 2007] [Lenshof et al., 2012]. Lorsqu'on génère une onde stationnaire de pression dans un canal, il est possible de déplacer des particules dans les nœuds ou dans les ventres de cette onde (voir section 3.5.5). En général les cellules dans des milieux biologiques ont plutôt tendance à se concentrer dans les nœuds [Hammarstrom et al., 2012]. En positionnant de façon contrôlée les nœuds de l'onde, il est donc possible de maîtriser précisément la trajectoire des cellules. En particulier, lorsque le nœud de l'onde se trouve au centre du canal, cette force peut donc être mise à profit pour déplacer des cellules vers un autre milieu (figure 6.1). A la sortie de ce dispositif, les cellules sont donc récupérées au centre du canal après avoir changé de milieu : c'est précisément notre objectif dans ce module, en amont du tri par DEP.

Ce principe a déjà été testé pour déplacer des globules rouges [Petersson et al., 2005] à un débit de



FIGURE 6.1 – Principe du changement de tampon [Petersson et al., 2005] : la suspension de cellules s'écoule dans les branches extérieures, alors qu'un autre milieu s'écoule au centre du micro-système (à gauche). Lorsqu'on génère une onde stationnaire dont le nœud se trouve au centre du canal, les cellules vont se déplacer selon cet axe et changer de milieu (à droite).

 $0.1 \text{ mL.min}^{-1}$  avec un rendement de 98% à partir d'une solution de globules rouges 20 fois moins concentrée que le sang. Plus récemment, un autre dispositif acoustique a été décrit et permet de déplacer indifféremment toutes les cellules sanguines à partir d'un échantillon non dilué dans un autre écoulement à des débits très élevés (1 L.h<sup>-1</sup>), avec une efficacité de 95% [Adams et al., 2012].

Cependant les propriétés acoustiques des particules biologiques ont été peu étudiées dans la littérature, et les études d'acoustophorèse sur cellules biologiques sont essentiellement expérimentales pour parvenir à déterminer le comportement des cellules dans une onde stationnaire ultrasonore. Au début de ces travaux de thèse, aucune étude à notre connaissance n'avait été publiée sur la manipulation de micro-organismes par acoustophorèse, alors que plusieurs études décrivaient déjà le comportement des globules rouges [Petersson et al., 2005].

Depuis peu, cette problématique commence à faire l'objet de travaux plus détaillés dans la littérature, et des études ont démontré la possibilité de concentrer des bactéries par forces acoustiques [Hammarstrom et al., 2012] [Toru et al., 2012], ce qui permet de justifier *a posteriori* que notre approche ambitieuse est bien réalisable.

# 6.1.2 Intégration de cette étape à notre protocole

Dans notre protocole, nous cherchons un moyen de modifier sans dilution les propriétés du milieu dans lequel se trouvent les cellules sanguines et les micro-organismes. L'utilisation des forces acoustiques pour répondre à cette problématique semblent particulièrement bien adaptée puisque ces forces ne dépendent pas de la conductivité de l'échantillon, au contraire des forces de DEP.

Nous souhaitons donc approfondir cette méthode avec deux objectifs :

- d'une part évaluer la possibilité de changer de milieu les cellules et les micro-organismes à partir d'un échantillon de sang, afin de les mettre en contact avec un milieu hypotonique pour lyser sélectivement les cellules sanguines et récupérer en sortie du microsystème un échantillon resuspendu dans un milieu faiblement conducteur, pouvant permettre un tri binaire par DEP.
- d'autre part étudier la possibilité de diminuer la complexité de l'échantillon en effectuant une étape de tri préliminaire qui permettrait de ne garder dans l'échantillon que les cellules qui ont les mêmes propriétés viscoélastiques que celles des bactéries.

# 6.2 Mise en place du banc expérimental

# 6.2.1 Génération d'une onde acoustique

Afin de générer des ondes de pression acoustique, nous avons utilisé des transducteurs piézoélectriques : ce sont des éléments qui se déforment lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique. Si on leur applique une tension sinusoïdale, ils se déforment périodiquement. Lorsqu'ils sont en contact avec un autre matériau, ils peuvent donc créer une vibration mécanique dans ce matériau, et une onde de pression se propage.

# 6.2.2 Obtention d'une onde acoustique stationnaire

Le point clé de cette méthode est de générer une onde de pression acoustique stationnaire dans la largeur du canal. Une onde stationnaire est obtenue par superpositions de plusieurs ondes progressives de même fréquence dans un même milieu (figure 6.2).



FIGURE 6.2 – Représentation schématique d'une onde de pression stationnaire.

Elle peut être créée par la réflexion d'une onde progressive générée par le transducteur piézoélectrique. C'est précisément ce cas-là que nous allons exploiter dans un canal microfluidique : l'onde de pression dans le liquide va se réfléchir sur les parois du canal. L'onde incidente et l'onde réfléchie vont donc se superposer. Si la largeur du canal est un multiple d'une demi-longueur d'onde, alors la superposition de ces 2 ondes formera une onde stationnaire (figure 6.3).

#### Chapitre 6. Optimisation du module d'échange de milieu : l'acoustophorèse



FIGURE 6.3 – Schéma des ondes stationnaires dans le canal lorsque la largeur du canal est égale à un multiple d'une demi-longueur d'onde de l'onde de pression.

La relation permettant de relier la fréquence de résonnance du canal (donc la fréquence de l'onde de pression que le transducteur piézoélectrique doit transmettre) à la largeur du canal est reprise par l'équation 6.1.

$$f_n = n \cdot \frac{c}{2L} \tag{6.1}$$

où *c* désigne la vitesse du son dans le milieu (en m.s<sup>-1</sup>) qui circule dans le microsystème, *L* la largeur du canal (en m) et *n* le nombre de nœuds de l'onde stationnaire dans le canal. Si on connait la fréquence de l'onde de pression qui sera transmise dans le milieu (qui est la même que la fréquence d'excitation du transducteur piézoélectrique), on peut déterminer la largeur du canal qu'il faut pour obtenir une onde stationnaire avec n nœuds.

Dans la configuration que nous souhaitons reproduire (figure 6.1), il ne doit y avoir qu'un seul nœud au centre du canal, donc n=1. Pour des ondes ultrasonores de quelques MHz, cela correspond à une largeur de canal de quelques centaines de  $\mu$ m : la microfluidique est donc particulièrement bien adaptée pour ce genre d'application.

Nous avons utilisé 2 types de transducteurs piézoélectriques (fournisseur : Noliac) avec des fréquences de résonnance de 3 et 5 MHz. Le tableau 6.1 fournit les valeurs de la largeur que le canal doit avoir pour résonner aux fréquences des transducteurs piézoélectriques.

Tableau 6.1 – Largeurs pour que le canal résonne aux fréquences des transducteurs piézoélectriques (le canal est supposé rempli d'eau).

fréquence d'excitation du tranducteur piézoélectrique	largeur du canal
3 MHz	246 µm
5 MHz	148 µm

#### 6.2.3 Choix du matériau

Pour avoir une bonne résonnance dans le canal, il faut que la réflexion de l'onde incidente sur les parois du canal soit la plus grande possible. Pour caractériser cette réflexion, on peut utiliser les coefficients de réflexion et de transmission décrits par l'équation 6.2 qui permettent de déterminer la quantité d'énergie réfléchie (coefficient  $R_{1-2}$ ) et transmise (coefficient  $T_{1-2}$ ) lors du passage d'une interface entre deux matériaux (matériau 1 vers matériau 2). La façon dont l'onde est transmise ou réfléchie dépend de la différence d'impédance acoustique (*Z*) de chaque matériau. Cette impédance acoustique est définie par l'équation 6.3, où  $\rho$  représente la masse volumique du matériau (en kg.m<sup>-3</sup>) et *c* la célérité du son dans ce matériau (en m.s<sup>-1</sup>).

$$R_{1-2} = \left(\frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2}\right)^2 \quad \text{et} \quad T_{1-2} = \frac{4Z_1 Z_2}{(Z_1 + Z_2)^2} \tag{6.2}$$

$$Z = \rho.c \tag{6.3}$$

Dans notre cas, pour caractériser la qualité du canal comme résonateur, il faut déterminer le coefficient  $R_{eau-paroi}$ . Si ce coefficient est faible, cela signifie qu'une grande partie de l'énergie de l'onde de pression incidente n'est pas réfléchie : tout l'enjeu ici est donc de trouver un matériau pour les parois du canal qui permet d'obtenir un coefficient le plus élevé possible.

Le tableau 6.2 récapitule les propriétés des matériaux les plus couramment utilisés en microfluidique.

Tableau 6.2 - Propriétés des matériaux couramment utilisés en microfluidique

matériau	masse volumique (kg. m $^{-3}$ )	vitesse du son (m.s <sup>-1</sup> )
silicium	2329	8433
PDMS <sup>1</sup> (1:10)	920	1076.5
PMMA <sup>2</sup>	1180	2680
verre (borosilicate)	2230	5640

Si on suppose que le milieu qui circule dans le canal est de l'eau (masse volumique = 1000 kg. m<sup>-3</sup> et vitesse de propagation du son = 1500 m. s<sup>-1</sup>) et si on applique la formule donnée par l'équation 6.2, on s'aperçoit que le coefficient de réflexion d'une onde de pression dans l'eau qui rencontre un mur en PDMS vaut 4.2% et 16% pour un mur en PMMA, alors qu'il s'élève à 62% si le mur est en verre et à 73.6% pour du silicium. Evidemment la qualité de la transmission de l'onde entre le transducteur piézo-électrique et le canal dépend aussi du mode d'assemblage et de la géométrie du système. Les valeurs calculées ici ont donc une valeur toute relative. Ils permettent néanmoins de conclure que les matériaux durs auront de meilleures performances. Pour notre étude, les micro-canaux seront donc gravés dans du silicium.

<sup>1.</sup> polydimethylsiloxane

<sup>2.</sup> polyméthacrylate de méthyle

# 6.2.4 Conception des puces

Nous avons fabriqué 2 types de puces en silicium :

- des puces avec des canaux gravés de 246µm de large, qui nous permettront d'obtenir une onde stationnaire de pression avec une fréquence de 3 MHz.
- et des puces avec des canaux gravés de 148µm de large, qui nous permettront d'obtenir une onde stationnaire de pression avec une fréquence de 5 MHz.

Ces deux types de canaux vont nous permettre d'étudier le comportement des cellules à deux fréquences différentes, afin de déterminer la fréquence optimale qui permettra de faire un transfert des cellules le plus rapide, ou qui permettra de faire un pré-tri entre les cellules sanguine et les microorganismes. En effet, les 2 types cellulaires ayant des structures différentes, il est tout à fait possible que les cellules sanguines et les bactéries ne réagissent pas de la même manière pour certaines fréquences d'excitation.

La profondeur des canaux est de 150µm. Cette profondeur nous permet d'obtenir des canaux de section rectangulaire (pour les canaux de 246µm de large), comme ce qui est habituellement décrit dans la littérature, mais aussi des canaux de section carré (pour les canaux de 148µm de large) (figure 6.4). Dans ces canaux de section carrée, nous souhaitons étudier la possibilité d'obtenir deux ondes stationnaires orthogonales à la fois dans la largeur et sur la hauteur du canal, pour obtenir une meilleure focalisation.





FIGURE 6.4 – Schémas de canaux de section rectangulaire (A) et de section carré (B) et des plans de focalisation par onde stationnaire.

Chaque canal possèdera trois entrées et trois sorties fluidiques (figure 6.5). Les trous permettant la connexion fluidique sont gravés dans le silicium, pour acheminer l'échantillon par la face arrière du micro-système. Cette méthode permet de laisser l'espace en face avant complètement libre pour l'observation au microscope.

# 6.2.5 Fabrication des puces

Les microsystèmes sont fabriqués sur des plaques de silicium de 100mm de diamètre. Des microcanaux de 150 µm de profondeur ont été gravés par gravure ionique réactive profonde (DRIE pour



FIGURE 6.5 – Rôle de chaque entrée et sortie de la puce dédiée au transfert de milieu.



FIGURE 6.6 – Photographie des puces d'acoustophorèse avant découpe.

*Deep Reactive Ion Etching* en anglais). Les trous traversants ont eux aussi été gravés par DRIE, après une nouvelle étape de dépôt de résine et de photolithographie. Un wafer en verre de 200µm d'épaisseur est ensuite collé par sérigraphie sur le wafer de silicium. La figure 6.6 présente les puces en silicium à la fin de la fabrication.

Un deuxième lot a été fabriqué en remplaçant l'étape de sérigraphie par un scellement anodique, pour garantir une meilleure étanchéité entre le silicium et le verre.

# 6.2.6 Montage pour assurer la transmission des ondes acoustiques

Le transducteur piézoélectrique est plaqué mécaniquement sur la face arrière des puces, ce qui permet une observation microscopique de tout le canal sur la face avant.

Idéalement, pour optimiser la transmission de l'onde de pression entre le transducteur et le silicium, le transducteur doit être collé sur la puce, ou être en contact avec un gel à ultrasons [Nilsson et al., 2004] [Petersson et al., 2004]. Dans notre configuration, le transducteur piézoélectrique ne sera pas

# Chapitre 6. Optimisation du module d'échange de milieu : l'acoustophorèse

collé mais seulement plaqué mécaniquement contre la puce : cela réduit sûrement l'efficacité de transmission de l'onde, mais ce montage nous permet de réutiliser les transducteurs piézoélectriques pour plusieurs tests. En effet, dans une optique de commercialisation, le produit de diagnotic *in vitro* que nous développons sera à usage unique pour des raisons de confinement du risque biologique et pour éviter les contaminations entre échantillons : il est donc avantageux de séparer le consommable (la puce en silicium et les tubes) en contact avec l'échantillon, du reste du système de caractérisation (le transducteur piézoélectrique).



FIGURE 6.7 – Schéma de l'assemblage du dispositif microfluidique et des transducteurs piézoélectriques avec tous les éléments du banc expérimental.

Les figures 6.7 et 6.8 illustrent le montage de la puce et du transducteur piézoélectrique : une plaque en exopy sert de support pour le transducteur piézoélectrique, et possède aussi un emplacement pour que le microsystème en silicium vienne s'y loger. Deux tiges métalliques au-dessus du microsystème permettent ensuite de contraindre mécaniquement l'ensemble. Ce montage astucieux permet d'assurer la reproductibilité du placement du transducteur sous le canal : sa position par rapport au canal central est fixée par les encoches de la plaque en epoxy, et sera donc toujours la même au cours des expériences. Nous souhaitons pouvoir utiliser deux transducteurs piézoélectriques différents pour investiguer le potentiel des forces acoustiques. La plaque en epoxy comporte donc 2



FIGURE 6.8 – Montage expérimental : vue de dessus (A) et vue de dessous (B).

encoches différentes pour les transducteurs piézoélectriques, car ils n'ont pas exactement les mêmes dimensions (tableau 6.3).

Tableau 6.3 – Dimens	sions caractéristiques	s des éléments du bar	nc expérimental.
rabieaa olo Dinieno	nono caracteriotique	aco cicilio aa sa	ie enpermienten.

élément	longueur (mm)	largeur (mm)	hauteur (mm)
piezo 3 MHz	10	10	0.62
piezo 5 MHz	16	8	0.42
puce silicium	65.5	10	0.72

La plaque en exopy montée avec le transducteur piézoélectrique et la puce en silicium s'insère ensuite dans une monture en aluminium, qui permet d'assurer l'étanchéité fluidique par le biais de joints toriques directement entre la puce en silicium et des tubes préalablement épanouis.

Ce montage permet de dégager une zone suffisamment grande sur le dessus de la puce pour permettre une observation du canal central au microscope.

# 6.2.7 Description du banc expérimental

Les transducteurs piézoélectriques sont alimentés avec un générateur basse fréquence (Agilent 33 250A) et un amplificateur de tension (AR France). L'amplitude du signal est mesurée à l'aide d'un oscilloscope (Tektronix TDS640A), et la température du transducteur piézoélectrique peut être mesurée à l'aide d'une thermistance PT100.

L'échantillon biologique est injecté dans le microsystème à l'aide d'un contrôleur en pression (Fluigent). L'intérêt principal de ce mode de régulation est d'obtenir une stabilisation de l'écoulement quasi instantanée, à l'inverse d'un système de contrôle en débit comme un pousse-seringue.

Une fois le transducteur piézoélectrique sous tension, le déplacement des cellules est observé avec un microscope (Zeiss) et les images peuvent être enregistrées à l'aide d'une caméra CCD (Hamamatsu Orca).

# 6.3 Expériences préliminaires : performances du microsystème pour la manipulation de billes et de cellules par forces acoustiques

# 6.3.1 Essais sur particules modèles

# 6.3.1.1 But des premières expériences

Le principal objectif de ces premiers essais est de valider le fonctionnement du résonateur en silicium et de vérifier que l'onde de pression est convenablement transmise du transducteur piézoélectrique au canal central. Si les forces acoustiques mises en jeu ne permettent pas d'observer un déplacement des billes vers le centre du canal (à l'emplacement attendu du nœud de l'onde stationnaire), cela signifiera :

- soit qu'aucune onde n'est transmise jusqu'au canal : il faudra alors peut-être coller le tranducteur piézoélectrique directement sur la puce en silicium au lieu de le plaquer mécaniquement,
- soit qu'aucune onde stationnaire ne s'est formée dans le canal : cela pourrait venir d'un manque de verticalité des parois du canal par exemple.

La figure 6.9 illustre le déplacement attendu des billes dans le canal central si l'onde de pression est correctement transmise dans le canal et si l'onde progressive se réfléchit correctement sur les parois du canal pour donner une onde stationnaire.

#### 6.3. Expériences préliminaires : performances du microsystème pour la manipulation de billes et de cellules par forces acoustiques



FIGURE 6.9 – Schéma de principe illustrant de déplacement attendu des billes dans le canal central de section carré.

# 6.3.1.2 Paramètres expérimentaux et résultats

**Expériences à faible débit** Pour ces premières expériences, nous avons utilisé une puce avec un canal central de largeur égale à 148  $\mu$ m, et un transducteur piézoélectrique donc la fréquence de résonnance se situe autour de 5 MHz. Une suspension de billes de 5 $\mu$ m et de 1 $\mu$ m (annexe A) est introduite en continu dans le canal central de 148 $\mu$ m en imposant une différence de pression entre l'entrée et la sortie du micro-système de 13mbar. Le transducteur piézoélectrique est ensuite mis sous tension avec un signal sinusoïdal de 4.88 MHz. Une tension d'environ 50 V est appliquée. Cette tension est choisie pour limiter l'échauffement du transducteur piézoélectrique tout en obtenant des forces acoustiques suffisamment intenses pour déplacer les billes. Des images sont enregistrées à une cadence de 2.3 images/secondes, avec un temps d'exposition de 50 ms.

La figure 6.10 illustre la trajectoire des billes au cours du temps après la mise sous tension du transducteur piézoélectrique. L'observation se fait avec un objectif 20x d'ouverture numérique 0.5 ce qui permet d'avoir une profondeur de champ d'une dizaine de  $\mu$ m : cela signifie qu'on observe simultanément toutes les billes présentes dans 10 $\mu$ m de hauteur de liquide.

Une fois le transducteur piézoélectrique en marche, on observe distinctement le mouvement général des billes, qui se déplacent vers le centre du canal. Cela confirme bien qu'une onde stationnaire s'est formée dans le canal avec un nœud de pression au centre.

Afin de connaitre le débit imposé par une différence de pression de 13mbar, on peut déterminer la vitesse des particules en analysant les images prises avec la caméra avec un temps d'exposition de 50ms. Sur les images de la figure 6.10, les billes de 5  $\mu$ m apparaissent sous forme de traits : la longueur d'un trait permet de connaitre la distance parcourue par une bille pendant 50  $\mu$ m. Les billes au centre circulent dans le canal avec une vitesse de 260  $\mu$ m.s<sup>-1</sup>. Le débit à l'intérieur de la puce est donc d'environ 10  $\mu$ L.h<sup>-1</sup>.

Les billes de 5 µm viennent se concentrer au centre du canal. De plus, la faible profondeur de champ

#### Chapitre 6. Optimisation du module d'échange de milieu : l'acoustophorèse



 $\label{eq:FIGURE 6.10-Resultats} FIGURE 6.10-Resultats de focalisation acoustique de billes de 1 et 5 \mu m dans un canal de section carré de 148 \mu m de côté, avec un débit de 10 <math display="inline">\mu L.h^{-1}.$ 

de l'objectif permet d'affirmer que les billes, une fois focalisées, sont toutes concentrées dans le même plan focal, à mi-hauteur du canal. En effet, la largeur et la profondeur des canaux de 150µm, permettent d'obtenir une résonnance simultanée en latéral et en vertical. On obtient donc dans cette configuration une ligne de focalisation, et non pas un plan sur toute la hauteur, comme ce serait le cas pour des canaux de section rectangulaire.

De même que la force de DEP, la force acoustique (équation 3.13) dépend du volume de la particule. Dans un microsystème où l'écoulement est laminaire, la force de Stokes qui s'oppose à ce mouvement est proportionnelle au rayon : la vitesse de la particule est donc proportionnelle au rayon au carré de cette particule. Si deux particules ont les mêmes propriétés acoustiques, la particule la plus petite aura une vitesse plus faible que la particule la plus volumineuse : c'est sur cette différence de vitesse que reposent beaucoup de méthodes de tri par force acoustique [Petersson et al., 2007]. L'utilisation d'un mélange de billes de 1 et 5  $\mu$ m nous permet d'illustrer le fait que la force acoustique dépend effectivement de la taille des particules : on constate en effet une concentration rapide des billes de 5  $\mu$ m, alors que les billes de 1  $\mu$ m restent dispersées dans tout le canal. Il faudrait sans doute augmenter la tension appliquée au transducteur piézoélectrique pour que les forces acoustiques aient un effet visible sur les plus petites particules.

# 6.3. Expériences préliminaires : performances du microsystème pour la manipulation de billes et de cellules par forces acoustiques

**Expériences à débit plus élevé** Pour tester les limites des forces acoustiques comme méthode pour déplacer rapidement des particules dans un canal microfluidique, nous avons augmenté le débit du fluide contenant les billes de 1 et  $5\mu$ m (figure 6.11). Les particules circulent désormais avec une vitesse de 4.2 mm. s<sup>-1</sup>, soit un débit d'environ 170 µl. h<sup>-1</sup>. Ce débit est du même ordre de grandeur que celui visé pour nos applications d'extraction de pathogènes dans le sang : en utilisant plusieurs canaux en parallèle, cela nous permet de tester un volume important d'échantillon (jusqu'à 1mL) en quelques heures.



 $\label{eq:FIGURE 6.11-Resultats} FIGURE 6.11-Résultats de focalisation acoustique de billes de 1 et 5 \mu m dans un canal de section carré de 150 \mu m de côté, avec un débit de 170 \mu L.h^{-1}.$ 

Les particules de  $5\mu m$  sont à nouveau focalisées sur une ligne au centre du canal, alors que les billes de  $1\mu m$  restent réparties uniformément dans tout le canal.

# 6.3.1.3 Conclusions

Ces expériences préliminaires nous permettent de confirmer que l'utilisation de forces acoustiques pour modifier la trajectoire des particules dans un micro-système est une bonne stratégie. Cependant nos conclusions sur les billes de 1 $\mu$ m laissent penser que la manipulation des particules dont la taille est de l'ordre du micron reste problématique. Il faut désormais déterminer la réaction de cellules biologiques aux forces acoustiques avant de pouvoir tirer une conclusion définitive sur la possibilité de l'utilisation de ces forces pour répondre à notre problématique, et notamment pour la manipulation des cellules dont la taille est proche du  $\mu$ m.

# 6.3.2 Essais sur du sang complet et sur des bactéries E. coli

Des essais préliminaires ont été effectués pour tester le potentiel des forces acoustiques pour déplacer des cellules sanguines et des micro-organismes, afin de valider notre approche.

**Paramètres expérimentaux** Pour tester l'acoustophorèse sur micro-organismes, nous avons utilisé des bactéries *E. coli* transformées avec un plasmide pGFP (protocole en annexe A). En effet, la profondeur du canal et la vitesse de l'écoulement ne permettent pas une observation directe des bactéries, un marquage fluorescent est donc nécessaire. De plus, pour confirmer qu'il est possible d'utiliser un échantillon non dilué en entrée de ce premier module, le deuxième échantillon testé est du sang total.

Ces expériences ont été réalisées avec un microsystème dont le canal mesure 246µm de large, le transducteur piézoélectrique de 3 MHz, avec un signal électrique de fréquence 3.1 MHz et d'amplitude 30 V. Le débit imposé dans le canal microfluidique et de l'ordre de 100µL/min.

**Observations du déplacement des cellules au centre du canal** Le déplacement des cellules sanguines et des micro-organismes au centre du canal est pratiquement instantané (figure 6.12) ce qui suggère que notre approche pour transférer les cellules dans un nouveau tampon par acoustophorèse est tout à fait réalisable, même pour des micro-organismes de quelques µm de long.

Ces expériences sont des essais préliminaires, et devront être confirmées et approfondies dans la suite des travaux.

# 6.4 Conclusion et perspectives

Le but de ce premier module est de faire circuler au centre d'un canal microfluidique un milieu peu conducteur et de faible osmolarité et d'y faire converger l'ensemble des cellules de l'échantillon sanguin, afin de se placer dans des conditions favorables pour effectuer un tri binaire par DEP dans un second module sans passer par une étape de dilution.

Même si la manipulation de particules dont le diamètre est de l'ordre du  $\mu$ m ne semble pas évidente pour les débits que l'on vise, les premières expériences sont prometteuses, avec notamment la validation d'un banc expérimental fonctionnel et de premières expériences sur cellules sanguines et sur bactéries encourageantes.

Puisque ce module n'a pas encore pu être suffisamment étudié pour remplir efficacement l'objectif de déplacer les cellules dans un milieu faiblement conducteur et hypotonique, dans la suite, les échantillons seront préparés en diluant l'échantillon sanguin par 20 avec de l'eau déionisée.

#### 6.4. Conclusion et perspectives



FIGURE 6.12 – Tests prélimaines d'acoustophorèse sur échantillons biologiques : (A) concentration de bactéries *E. coli*au centre du canal et (B) concentration des cellules sanguines à partir de sang total au centre du canal.

**Partie IV** 

# Module de DEP : optimisation du tri cellulaire

Le but de cette partie IV est de développer le concept de capture par DEP des micro-organismes dans un échantillon sanguin dont la conductivité et l'osmolarité ont été abaissées dans le premier module. Ce deuxième module devra donc assurer une capture générique des différents micro-organismes la plus efficace possible tout en préservant leur viabilité.

Le chapitre 7 détaille l'élaboration d'un modèle numérique permettant de simuler la distribution de la force de DEP dans le micro-système, et la vérification de l'adéquation entre les observations expérimentales et les résultats de simulation numérique. Le chapitre 8 détaille l'exploitation de ce modèle numérique pour optimiser différents paramètres du micro-système afin de garantir une capture la plus efficace possible. Pour finir, le chapitre 9 détaille les performances expérimentales du module de tri de micro-organismes, en déterminant en particulier le taux de capture des micro-organismes à partir d'un échantillon biologique complexe et leur viabilité après l'étape de tri.

# 7 Capture de cellules sanguines et de micro-organismes par DEP sans flux

La force de diélectrophorèse est le résultat de l'interaction entre un dipôle (induit par l'application du champ électrique) et la non-uniformité du champ électrique autour de la particule. Cette section détaille les équations théoriques qui décrivent la force de DEP, la mise en place d'un modèle numérique pour la simulation de cette force dans un canal micro-fluidique puis la comparaison entre les résultats numériques et les résultats expérimentaux pour la capture de micro-organismes par DEP.

# 7.1 Rappels théoriques

#### 7.1.1 Interaction champ-cellule

Lorsque qu'une particule polarisable est exposée à un champ électrique, des charges apparaissent à l'interface entre la particule et le milieu extérieur, ce qui conduit à l'apparition d'un dipôle électrique induit par le champ électrique.

Le moment dipolaire  $\vec{m}$  induit par un champ électrique  $\vec{E}$  est donné par :

$$\vec{m} = \alpha \vec{E} \tag{7.1}$$

où  $\alpha$  est la polarisabilité de la particule dans un milieu donné. Plus la polarisabilité est grande, plus la distribution de charge du système est perturbée par le champ électrique.

Lorsque le champ est sinusoïdal (on note  $E(t) = E_0 cos(\omega t + \Phi)$  où  $\omega$  est la pulsation du champ ( $\omega = 2\pi f$  où f est la fréquence) et  $\Phi$  la phase du champ), la polarisabilité d'une cellule peut en réalité s'exprimer sous forme complexe. Pour une particule sphérique de rayon r, elle s'exprime sous la forme :

$$\underline{\alpha} = 4\pi\epsilon_0\epsilon_{ext}r^3 \underline{f}_{CM} \tag{7.2}$$

où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide,  $\epsilon_{ext}$  est la permittivité relative du milieu extérieur et  $\underline{f}_{CM}$  le coefficient

de Clausius-Mossoti. La section 5.1 reprend en détail le calcul de ce facteur pour les différentes populations de cellules sanguines et pour des micro-organismes.

La force de diélectrophorèse est donnée par :

$$\vec{F}_{DEP} = -\vec{\nabla}W$$

$$= (\vec{m}.\vec{\nabla})\vec{E}$$
(7.3)

(7.4)

Lorsque l'on moyenne la force de DEP sur une période temporelle du champ, on obtient l'expression :

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = 2\pi\epsilon_0 \epsilon_{ext} r^3 Re[\underline{f}_{CM}] \vec{\nabla} |E_{rms}|^2 + 4\pi\epsilon_0 \epsilon_{ext} r^3 Im[\underline{f}_{CM}] \sum_{xyz} E_{rms,i}^2 \vec{\nabla} \Phi_i$$
(7.5)

où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide (en F.m<sup>-1</sup>),  $\epsilon_{ext}$  la permittivité relative du milieu extérieur (sans dimention), r le rayon de la cellule (en m),  $\underline{f}_{CM}$  le facteur de Clausius-Mossoti,  $E_{rms}$  est la valeur efficace du champ et  $\Phi$  sa phase.

Ainsi on en déduit qu'une inhomogénéité en amplitude ( $\vec{\nabla} E_{rms}^2 \neq 0$ ) (équation 7.6) ou une inhomogénéité en phase ( $\nabla \Phi \neq 0$ ) (équation 7.7) peuvent toutes deux créer une force de diélectrophorèse, qu'on appelle respectivement '*conventional DEP*' ou '*traveling-wave DEP*'.

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = 2\pi\epsilon_0 \epsilon_{ext} r^3 Re[\underline{f}_{CM}] \vec{\nabla} |E_{rms}|^2$$
(7.6)

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = 4\pi\epsilon_0 \epsilon_{ext} r^3 Im[\underline{f}_{CM}] \sum_{xyz} E_{rms,i}^2 \vec{\nabla} \Phi_i$$
(7.7)

#### 7.1.2 DEP+, DEP- et électrophorèse

Lorsque la particule est plus polarisable que le milieu (le facteur  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  est positif), on parle de diélectrophorèse positive (DEP+) : la particule est alors attirée vers les zones où le champ est le plus intense (figure 7.1.A). Inversement, lorsque la particule est moins polarisable que le milieu (le facteur  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  est négatif), on parle de diélectrophorèse négative (DEP-) : la particule est alors attirée vers les zones où le champ est le moins intense (figure 7.1.B).

Alors que la diélectrophorèse correspond au mouvement d'une particule neutre polarisable dans un champ électrique non-uniforme, l'électrophorèse correspond au mouvement d'une particule chargée dans un champ électrique. La force qui met en mouvement la particule est proportionnelle au champ électrique et à la charge de surface de la particule. Si la particule est globalement neutre, elle ne pourra pas être mise en mouvement sous l'effet d'un champ électrique uniforme, même si elle est fortement polarisable (figure 7.2).



FIGURE 7.1 – Force de DEP : on parle de DEP+ lorsque la particule est plus polarisable que le milieu (A) ou de DEP- lorsque la particule est moins polarisable que le milieu (B).

FIGURE 7.2 – Lorsque le champ est uniforme la résultante des forces est nulle pour une particule neutre. Il n'y a donc pas de déplacement de la cellule, même si elle est polarisable).

Les cellules biologiques sont polarisables mais possèdent aussi très souvent une charge de surface. Le recours à un signal électrique sinusoïdal permet alors d'éliminer les effets de la force d'électrophorèse. En effet, sur une période, le mouvement de la cellule sous l'effet de l'électrophorèse sera globalement nul puisque la force dépend du sens du champ.

# 7.2 Modèle numérique et résolution par éléments finis

La force de DEP dépend de deux facteurs principaux : la polarisabilité des particules (propriété étudiée dans la partie précédente), et la répartition du champ électrique généré par le réseau d'électrodes. Il est donc nécessaire de connaître la répartition spatiale du champ dans le microsystème, et plus particulièrement la distribution de  $\vec{\nabla} E^2$ , pour pouvoir prédire la trajectoire des cellules.

Pour le dispositif que nous souhaitons utiliser, le champ électrique sera généré à l'aide d'un réseau d'électrodes interdigitées, avec 10 électrodes alimentées en différentiel (figure 7.3) : la phase  $\Phi$  de ce champ ne varie pas, donc seule la partie réelle du facteur CM intervient dans le calcul de la force de DEP (équation 7.6).



FIGURE 7.3 – Réseau d'électrodes interdigitées au fond du canal micro-fluidique recouvert d'une couche de passivation : (A) vue du dessus (B) vue en coupe verticale.

Le réseau d'électrodes sera recouvert d'une couche de passivation, ce qui permet de minimiser les réactions électro-chimiques entre les électrodes et le milieu biologique, et donc de pouvoir utiliser le microsystème plus longtemps.

La distribution du champ électrique généré par une structure interdigitée a déjà été étudiée dans la littérature par différentes méthodes analytiques. L'équipe de Ramos décrit par exemple une solution analytique de ce problème en utilisant une décomposition en séries de Fourier [Morgan et al., 2001]. D'autres équipes, notamment celle de Burnier, confirment la concordance entre les estimations analytiques et les résultats expérimentaux, en estimant la force de DEP mise en jeu sur des globules rouges dans un canal micro-fluidique qui possède 2 réseaux d'électrodes interdigitées face à face en haut et en bas du canal [Nerguizian et al., 2012]. Ils comparent aussi leurs résultats avec une modélisation de la répartition du champ à l'aide du logiciel de simulation numérique COMSOL, et démontrent l'équivalence de ces deux méthodes de résolution. Les travaux de Alazzam [Alazzam et al.,

2010] permettent aussi de mettre en évidence la cohérence entre résolution analytique, numérique et résultats expérimentaux.

Nous avons choisi une méthode de résolution numérique pour déterminer la répartition du champ électrique dans le canal microfluidique, à l'aide du logiciel COMSOL. La force de ce logiciel est de pouvoir résoudre des problèmes physiques multiparamétrés : même si nous cherchons ici à résoudre un problème relativement simple, cette option peut permettre d'envisager par la suite l'étude de problèmes plus complexes, comme par exemple la prise en compte des effets électrothermiques dûs à l'élévation locale de la température par effet Joule aux niveaux des électrodes. Le recours à un modèle numérique nous permet aussi de prendre en compte la présence d'une couche de passivation sur la répartition générale du champ électrique dans le canal.

# 7.2.1 Géométrie et conditions aux limites

Afin de pouvoir connaître la répartition du potentiel électrique V dans tout le canal, il faut définir les limites du domaine sur lequel nous allons travailler. Seules 2 demi-électrodes et l'espace interélectrode (défini dans la suite du manuscrit par le terme 'gap') sont pris en compte dans ce modèle géométrique (figure 7.4 A) : une condition d'anti-périodicité au centre de chaque électrode permet de compléter le réseau à l'infini. On considère donc ici la simulation d'un nombre infini d'électrodes : les effets de bord qui se produisent au niveau de la première et de la dernière électrode ne sont pas pris en compte. La géométrie du canal est définie en 2 dimensions, en faisant l'hypothèse d'un canal infiniment large. Cela permet d'alléger le maillage de la structure et donc de raccourcir le temps de calcul.

Les conditions aux limites définies dans nos simulations sont les suivantes (figure 7.4 B) :

- un potentiel électrique de +V/2 ou -V/2 est imposé aux bornes des électrodes,
- la zone entre les électrodes et le haut du canal sont considérés comme des isolants,
- et les frontières à gauche et à droite de la structure respectent des conditions d'antipériodicité.



Chapitre 7. Capture de cellules sanguines et de micro-organismes par DEP sans flux

FIGURE 7.4 – Modélisation du microsystème sous COMSOL : (A) Schéma de la zone du micro-système modélisé (l'ensemble du micro-système peut ensuite être obtenu par anti-symétrie) et (B) Schéma et conditions aux limites du modèle géométrique utilisé.

#### 7.2.2 Répartition du champ électrique et force de DEP

Le potentiel V peut alors être calculé en tout point du maillage en résolvant l'équation de Laplace : la figure 7.5 A illustre la distribution de cette variable dans le canal microfluidique.

La distribution du champ électrique  $\vec{E}$  est ensuite obtenue à partir des valeurs du potentiel V suivant l'équation 7.8.

$$\vec{E} = -\vec{\nabla}V \tag{7.8}$$

La répartition du champ électrique à partir du modèle géométrique décrit précédemment est illustrée figure 7.5 B. L'échelle de couleur permet de distinguer les zones où le champ est le plus intense (à l'interface entre le gap et les électrodes) et les zones où il est le plus faible (au centre des électrodes, en haut du canal).

La dernière étape consiste à déterminer la distribution de  $\vec{\nabla}|E|^2$  (figure 7.5 C), qui est calculé à partir de la distribution du champ électrique avec l'équation 7.9.



FIGURE 7.5 – Répartition du potentiel électrique V (A), du champ électrique (B) et de la norme de  $\vec{\nabla}|E|^2$  (C) au sein du canal microfluidique.

$$\nabla |E|_{x}^{2} = 2 \frac{\partial E_{x}}{\partial x} E_{x} + 2 \frac{\partial E_{y}}{\partial x} E_{y}$$

$$\nabla |E|_{y}^{2} = 2 \frac{\partial E_{x}}{\partial y} E_{x} + 2 \frac{\partial E_{y}}{\partial y} E_{y}$$
(7.9)

La direction de la force de DEP est directement déterminée par la direction de ce vecteur, mais son sens est donné par le signe de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] :

- si le coefficient Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] est positif (DEP+), alors la force de DEP et le vecteur  $\vec{\nabla}|E|^2$  seront dans le même sens,
- − si le coefficient  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  est négatif (DEP-), alors la force de DEP et le vecteur  $\vec{\nabla}|E|^2$  auront des sens

opposés.

Les vecteurs  $\vec{\nabla}|E|^2$  et  $-\vec{\nabla}|E|^2$  sont représentés figure 7.6. L'amplitude des vecteurs est directement proportionnelle à l'amplitude de la force de DEP : cette distribution permet donc de noter que l'intensité de la force de DEP diminue fortement lorsque l'on s'éloigne de l'interface gap-électrode. En effet, plus on s'éloigne de ces points singuliers, plus le champ devient uniforme, donc la valeur du gradient de champ, et *a fortiori* celle de la force de DEP, diminuent.



FIGURE 7.6 – Distribution des vecteurs  $\vec{\nabla}|E|^2$  (A et C) et  $-\vec{\nabla}|E|^2$  (B et D) en différents points du canal. Les flèches sont représentées à l'échelle pour les images A et B et sont normalisées pour plus de lisibilité pour les images C et D.

#### 7.2.3 Positions d'équilibre DEP+/DEP-

Les cellules soumises à une force de DEP+ vont suivre des trajectoires déterminées par les flèches représentant  $\vec{\nabla}|E|^2$ . A l'inverse, les cellules soumises à une force de DEP- suivront des trajectoires déterminées par  $\vec{\nabla}|E|^2$ .

On peut ainsi distinguer deux positions d'équilibre distinctes :

- le bord des électrodes, à l'interface entre l'électrode et le gap : cette zone correspond à l'aire de capture par DEP+,
- le centre des électrodes, en haut du canal : cette zone correspond à l'aire de capture par DEP-.



FIGURE 7.7 – Représentation schématique des aires de capture par DEP+ (zones rouges) et par DEP- (zones vertes).

Ainsi, une particule soumise à une force de DEP+ se dirigera vers l'interface gap-électrode la plus proche (zones rouges sur la figure 7.7), alors qu'une particule soumise à une force de DEP- sera repoussée du bord des électrodes et se dirigera vers le haut du canal, au centre des électrodes (zones vertes sur la figure 7.7).

A noter que la position d'équilibre en DEP- est assurée par une force beaucoup plus faible que pour la position d'équilibre en DEP+, car le gradient y est beaucoup plus faible.

# 7.3 Validation expérimentale des zones de capture DEP+/DEP-

Après avoir étudié théoriquement les différentes positions d'équilibre des particules suivant le signe de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ], nous avons tenté de vérifier expérimentalement cette analyse.

#### 7.3.1 Montage expérimental

Les microsystèmes utilisés pour ces premières expériences de diélectrophorèse ont été fabriquées dans le cadre d'un ancien projet du CEA. Nous avons pu avoir accès à quelques dispositifs pour faire des expériences préliminaires.

# 7.3.1.1 Description des microsystèmes

Les microsystèmes ont été fabriqués sur une plaque de silicium de 100mm de diamètre, sur lequel une couche d'oxyde de 1µm d'épaisseur a été obtenue par oxydation humide. Des couches de titane



FIGURE 7.8 – Microsystèmes utilisés pour les premières expériences de manipulation de cellules par DEP

(100nm) et d'or (400nm) sont ensuite déposées par pulvérisation cathodique. Les électrodes de 90 $\mu$ m, espacées de 10 $\mu$ m, sont gravées après une étape de photolithographie, puis une couche d'oxyde de silicium de 200nm est déposée par dépôt chimique en phase vapeur (chemical vapor deposition ou CVD) sur tout le wafer avant d'être ouverte au niveau des reprises de contact par des étapes de photolithographie et de gravure.



FIGURE 7.9 – Schéma de l'assemblage de la chambre micro-fluidique sur le réseau d'électrodes à l'aide d'adhésif double face.

Les puces sont ensuite découpées, puis scellées sur un circuit imprimé pour faciliter les reprises de contact. Les connections électriques entre la puce et le circuit intégré sont assurées par une étape de cablâge (figure 7.8).

Pour fabriquer une chambre de capture au-dessus des électrodes, nous avons utilisé de l'adhésif double face de  $30\mu m$  d'épaisseur (Nitto Denko MC-2033) (figure 7.9). La chambre est ensuite recouverte d'une lamelle de microscope de  $170\mu m$  d'épaisseur.

# 7.3.1.2 Description du banc expérimental

L'échantillon est introduit dans la chambre (dont le volume fait quelques  $\mu$ L) en déposant une goutte à l'entrée. La chambre se remplit par capillarité. L'entrée et la sortie de la chambre sont ensuite recouvertes de deux gouttes d'huile biocompatible (huile de paraffine (bioMérieux)) pour éviter l'évaporation de la solution. Ces microsystèmes seront donc utilisés uniquement en régime statique, sans débit imposé dans le canal.

В



FIGURE 7.10 – Banc expérimental : (A) montage de la puce et (B) observation au microscope.

Un générateur de fonction (Agilent 33 250A) permet d'alimenter le microsystème avec un signal sinusoïdal de fréquence de 0 à 80 MHz. Les paramètres du signal électrique (amplitude et fréquence) sont supervisés à l'aide d'un oscilloscope (Tektronix TDS640A).

Le déplacement des cellules est observé à l'aide d'un microscope (Zeiss) (figure 7.10), et les images peuvent être enregistrées l'aide d'une caméra CDD (Hamamatsu Orca).

# 7.3.2 Manipulation et capture de E. coli

Le premier échantillon testé est une suspension de bactéries *E. coli* DsRed dans de l'eau déionisée (conductivité mesurée :  $0.1 \text{ mS.m}^{-1}$ ). Le réseau d'électrodes interdigitées est alimenté par un signal sinusoïdal de 1 V<sub>pp</sub> et de fréquence 3 MHz. Des images sont ensuite enregistrées à l'aide d'un appareil photo adapté sur le microscope. Sous l'effet du champ électrique, les bactéries se concentrent petit à petit selon des lignes horizontales, qui correspondent aux gaps du réseau d'électrodes interdigitées (figure 7.11).

Pour avoir plus de précision sur la trajectoire et la position des bactéries sous l'effet du champ électrique, une expérience similaire a été faite en observant cette fois-ci les bactéries à l'aide d'une

#### Chapitre 7. Capture de cellules sanguines et de micro-organismes par DEP sans flux



FIGURE 7.11 – Déplacement de *E. coli* vers la zone d'équilibre de DEP+ sous l'effet d'un champ électrique non-uniforme de fréquence 3 MHz.

caméra noir et blanc et d'un objectif 40x. L'amplitude de la tension sinusoïdale a été augmentée d'un facteur 10, pour augmenter le champ à l'intérieur de la puce et ainsi augmenter la vitesse des bactéries, afin qu'elles atteignent plus rapidement leur position d'équilibre. La figure 7.12 A reflète donc la même expérience que précédemment avec un signal électrique dont la fréquence vaut 3 MHz : on peut alors constater qu'en réalité, au sein d'un gap, les bactéries se concentrent le long de deux bandes horizontales fines et espacées l'une de l'autre de 10µm. Elles ne recouvrent pas tout le gap mais s'alignent le long des interfaces gap-électrodes.

Si l'on modifie la fréquence du signal électrique de 3 MHz à 100 kHz, les bactéries se remettent alors en mouvement pour venir se positionner au centre des électrodes (figure 7.12 B).

Ces expériences nous permettent de confirmer les 2 positions d'équilibre déterminées précédemment par simulation : les interfaces gap-électrodes et le centre des électrodes. Il est possible de déplacer les bactéries vers l'une ou l'autre de ces zones en changeant la fréquence du signal électrique, ce qui modifie le signe de Re[ $\underline{f}_{CM}$ ].

De plus, visuellement, on peut constater une différence sur la forme des bactéries entre les deux positions d'équilibres : elles sont allongées lorsqu'elles se situent aux interfaces gap-électrodes, et apparaîssent pratiquement sphériques lorsqu'elles sont concentrées au centre des électrodes. Ce phénomène est décrit dans la littérature sous le nom d'électro-orientation [Gimsa, 2001] [Kriegmaier



FIGURE 7.12 – Capture de *E. coli* dans la zone d'équilibre de DEP+ sous l'effet d'un champ de fréquence 3 MHz (A) et dans la zone d'équilibre de DEP- sous l'effet d'un champ de fréquence 100 kHz (B).

et al., 2001], et rend compte du fait qu'une cellule non-sphérique peut s'orienter selon les lignes de champ afin de minimiser son énergie d'interaction avec le champ électrique.

La figure 7.13 représente de façon schématique l'orientation des bactéries alignées sur les lignes de champ dans les zones de DEP+ et DEP-.





FIGURE 7.13 – Représentation schématique de la capture de *E. coli* dans la zone d'équilibre de DEP+ (A) et dans la zone d'équilibre de DEP- (B).

# 7.3.3 Manipulation et capture de C. albicans

Afin de s'assurer que la manipulation par DEP est envisageable sur une large gamme de microorganismes, le deuxième échantillon testé est une suspension de levures *C. albicans* dans de l'eau déionisée. Comme précédemment, l'observation se fait à l'aide d'un microscope et d'un objectif 40x. Les dimensions des levures ( $6\mu$ m de diamètre) sont suffisamment grandes pour permettre une observation directe sans marquage fluorescent. La figure 7.14 illustre les positions d'équilibre des levures après la mise en route d'un signal électrique de 10 V<sub>pp</sub> et pour deux fréquences différentes.

A l'instar des bactéries *E. coli*, lorsque la fréquence du signal vaut 3 MHz, les cellules se concentrent au niveau des interfaces gap-électrodes, alors que lorsqu'elle vaut 100 kHz, les cellules se concentrent alors au centre des électrodes. La faible profondeur de champ de l'objectif x40 (moins d'une dizaine de  $\mu$ m) nous permet de connaître la hauteur des cellules dans le canal en ajustant la netteté de l'image sur les cellules. Avec un signal de fréquence 3 MHz, les cellules et les électrodes sont nettes simultanément sur les images : les cellules sont donc bien concentrées au niveau des électrodes. Mais à 100 kHz, les cellules deviennent nettes lorsque l'on élève la platine du microscope de 30 $\mu$ m pour



FIGURE 7.14 – Capture de *C. albicans* dans la zone d'équilibre de DEP+ sous l'effet d'un champ de fréquence 3 MHz (A) et dans la zone d'équilibre de DEP- sous l'effet d'un champ de fréquence 100 kHz (B).

refocaliser l'image : cela signifie que les cellules se situent 30µm au-dessus des électrodes. La figure 7.15 représente de façon schématique la position des levures dans les zones de DEP+ et DEP-.

Ce déplacement en hauteur dans le canal est aussi prédit par les simulations, qui nous ont permis de déterminer que les positions d'équilibre DEP+ et DEP- ne se situent pas à la même hauteur dans le canal. Néanmoins les simulations ne reflétaient que l'influence de la force de DEP, sans prendre en compte la gravité. Ces expériences nous montrent que même dans la zone de capture de DEP-, là où la force est la plus faible, la gravité reste plus faible que la force de DEP puisque les cellules sont au niveau du capot en verre, en haut du canal.

Cependant certaines cellules ne suivent pas le mouvement général. En effet, quelques levures (environ 5%) restent adsorbées à la surface de la puce en silicium, sans que les forces de DEP ne soient suffisantes pour les désorber. Par ailleurs, une partie des levures (environ 15%) restent dans les zones de DEP- quelle que soit la fréquence du signal électrique : cette observation est certainement la conséquence de l'électro-perméabilisation des parois des levures sous l'effet du champ électrique. Comme nous l'avons vu précédemment, la perméabilisation des cellules peut avoir une influence sur le signe de la force de DEP. Cela signifie que la viabilité des micro-organismes après la capture par DEP peut être problématique, et nous y prêterons une attention toute particulière section 9.4.




FIGURE 7.15 – Représentation schématique de la capture de *C. albicans* dans la zone d'équilibre de DEP+ (A) et dans la zone d'équilibre de DEP- (B).

#### 7.3.4 Séparation des différentes populations cellulaires

Après avoir démontré la possibilité de manipuler des micro-organismes par DEP, et confirmé qu'on parvenait à obtenir expérimentalement les deux positions d'équilibre de DEP+ et DEP- calculées par simulation numérique, nous allons désormais évaluer expérimentalement la possibilité de séparer par DEP des micro-organismes d'un échantillon de sang. Le montage expérimental est le même que celui présenté précédemment section 7.3.1.

#### 7.3.4.1 Préparation des échantillons

Dans un premier temps, afin de diminuer la complexité de l'échantillon sanguin pour faciliter l'observation du comportement des différents types cellulaires, nous avons choisi de ne travailler qu'avec une solution de globules rouges, et non pas à partir d'un échantillon de sang complet. Pour compléter ces expériences, l'étude du comportement des autres populations de cellules sanguines sera détaillée dans une prochaine étape, section 9.2.

L'échantillon est préparé en mélangeant 25  $\mu$ L de suspension de micro-organismes suspendus dans l'eau déionsiée (*E. coli, S. epidermidis* ou *C. albicans*), 25  $\mu$ L d'eau dé-ionisée et 1  $\mu$ L de globules rouges concentrés. Les concentrations cellulaires dans l'échantillon valent environ 2.5 10<sup>8</sup> ufc/mL pour *E. coli*, 5 10<sup>7</sup> ufc/mL pour *S. epidermidis*, 5 10<sup>6</sup> ufc/mL pour *C. albicans*, et 2 10<sup>8</sup> cellules /mL pour les globules rouges. La conductivité du milieu vaut 10 mS.m<sup>-1</sup>.

La faible osmolarité du milieu (les cellules sont en effet suspendues dans de l'eau déionisée) permet de perméabiliser sélectivement les globules rouges. La diminution de la conductivité de l'échantillon par rapport à un échantillon de sang (10 mS.m<sup>-1</sup> au lieu de 1.6 S.m<sup>-1</sup>) permet d'envisager une séparation binaire, avec à la fois des forces de DEP+ et DEP- en fonction de la fréquence du signal électrique.

#### 7.3.4.2 Expériences de séparation

Pour les trois micro-organismes, lorsque les mélanges sont soumis à un champ électrique généré par le réseau d'électrodes alimenté par un signal d'amplitude  $10 V_{pp}$  et de fréquence 20 MHz, les micro-organismes se concentrent sur le bord des électrodes. Ils sont donc soumis à une force de DEP+. En parallèle, les globules rouges perméabilisés sont soumis à une force de DEP- et se concentrent sur le haut du micro-système, au-dessus du centre des électrodes (figure 7.16). Les trois micro-organismes du modèle biologique sont tous attirés dans la zone de capture de DEP+ à 20 MHz, ce qui permet de valider expérimentalement la capture générique de micro-organismes de structure différente. La détermination de la fréquence la plus appropriée pour une capture générique de micro-organismes dans un échantillon sanguin sera détaillée dans la suite de l'étude, section 9.2.

Une fois les micro-organismes capturés, un signal de fréquence 50 kHz est appliqué pour les soumettre à une force de DEP- afin les libérer. Le tableau 7.1 rassemble les résultats de capture et de relargage pour *E. coli*, *C. albicans* et *S. epidermidis*.

Tableau 7.1 – Efficacité de capture (DEP+) et de relargage (DEP-) des micro-organismes dans un mélange de globules rouges dont la conductivité vaut 10 mS.m<sup>-1</sup>.

type cellulaire	capture par DEP+ (20 MHz)	libération par DEP- (50 kHz)
E. coli	97%	94%
C. albicans	92%	56%
S. epidermidis	71 %	0%

Alors que la majorité des bactéries *E. coli* sont repoussées du bord des électrodes pour DEP-, seule la moitié des levures *C. albicans* réagissent à cette force opposée. Une fois capturées en DEP+, aucune bactérie *S. epidermidis* ne réagit à ce changement de sens de la force.

La différence de taux de relargage peut certainement s'expliquer par la motilité propre des bactéries *E. coli* [Mitchell and Kogure, 2005], qui les empêche de s'adsorber de manière non-spécifique à la surface du micro-système. A l'inverse, les bactéries *S. epidermidis* s'adorbent très facilement aux surfaces [Weaver et al., 2012]. Cette facilité à former des interactions non-spécifiques avec les surfaces rend plus difficile le contrôle des cellules grâce aux forces de DEP. Une fois les cellules en contact



Chapitre 7. Capture de cellules sanguines et de micro-organismes par DEP sans flux

FIGURE 7.16 – Illustration des forces de DEP générées par un réseau d'électrodes interdigitées alimentées par un signal de 10  $V_{pp}$  à 20 MHz (DEP+) (A) et 50kHz (DEP-) (B) sur *E. coli*, et à 20MHz (DEP+) sur *C. albicans* (C) et *S. epidermidis* (D).

avec la couche de passivation en DEP+, il devient difficile de les désorber pour les relarguer. On pourrait par exemple utiliser de la BSA (Bovine Serum Albumine) ou un autre agent de recouvrement de surface, pour limiter cette adsorption.

Par ailleurs, cette campagne d'expériences a été effectuée sans imposer de débit dans la chambre de capture. Le recours à un flux externe pourra très certainement améliorer le rendement de relargage des bactéries *S. epidermidis* et des levures *C. albicans*, en appliquant une nouvelle force d'entraînement sur les cellules.

## 7.4 Bilan des forces

#### 7.4.1 Gravité

L'observation du mouvement des cellules à l'aide d'un microscope et d'un objectif 40x de faible profondeur de champ nous a permis de déterminer précisément la hauteur des cellules au cours des expériences. Nous avons notamment pu observer que la position d'équilibre des cellules soumises à une force de DEP- ne se situait pas dans le même plan que les électrodes au fond du canal microfluidique, mais au contraire au niveau du capot en verre. Cela signifie que dans notre microsystème, les forces de DEP sont suffisamment intenses pour contrecarrer les effets de la gravité, et ce même pour la position d'équilibre en DEP-, où la force est la moins intense.

Une brève comparaison théorique des forces permet de confirmer ces observations expérimentales. En effet, pour une bactérie, une levure ou un globule rouge perméabilisé, dont les diamètres respectifs sont estimés à 2µm, 6µm et 7µm, la vitesse de sédimentation  $v_s$  imposée par la gravité vaut respectivement 1.4  $10^{-3}$  µm.s<sup>-1</sup>, 1.3  $10^{-2}$  µm.s<sup>-1</sup> et 2  $10^{-3}$  µm.s<sup>-1</sup> (équation 7.10) sous l'hypothèse que les cellules aient une forme sphérique.

$$\nu_s = \frac{2}{9} \frac{\rho_p - \rho_m}{\eta} g r^2 \tag{7.10}$$

où  $\rho_m$  et  $\rho_p$  sont les densités du milieu et de la particule (en kg.m<sup>-3</sup>),  $\eta$  la viscosité dynamique du milieu (en Pa.s<sup>-1</sup>), g la valeur de la gravité (en m.<sup>-2</sup>s) et *r* le rayon de la particule (en m).

En comparaison, la vitesse induite par les forces de DEP sur une bactérie *E. coli* peut atteindre 200  $\mu$ m.s<sup>-1</sup> [Castellanos et al., 2003]. En outre, puisque la force de DEP dépend du volume de la particule, cette vitesse pourra être bien plus élevée dans le cas de cellules plus volumineuses, comme *C. albicans*.

#### 7.4.2 DEP

Pour s'assurer que la force de DEP est bien la force qui met en mouvement les cellules (et donc que les autres forces électrodynamiques sont négligeables devant elle), on peut chercher à vérifier expérimentalement la relation 7.11 (les détails de l'obtention de cette relation ont été rappelés section 3.3.2).

$$\vec{F}_{\text{Stokes}} + \vec{F}_{DEP} = \vec{0} \tag{7.11}$$

L'expression de la force de DEP qui s'exerce sur une particule sphérique est rappelée par l'équation 7.12 et la force de frottement imposée par la viscosité du liquide en régime laminaire sur une particule sphérique est donnée par la loi de Stokes (équation 7.13).

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_{ext}r^3Re[\underline{f}_{CM}]\vec{\nabla}|E|^2$$
(7.12)

$$\vec{F}_{drag} = -6\pi r \eta \vec{v} \tag{7.13}$$

Vérifier la relation 7.11 revient à démontrer qu'il existe une relation de proportionnalité entre la vitesse de la particule et le gradient de champ électrique dans le canal microfluidique :

$$\begin{array}{l}
\nu_x \propto \nabla |E|_x^2 \\
\nu_y \propto \nabla |E|_y^2
\end{array} \tag{7.14}$$

Expérimentalement, en suivant la trajectoire d'une cellule soumise à une force de DEP+ sur une succession de prises d'images, il est possible de connaître la composante horizontale de sa vitesse moyenne entre 2 images successives. Pour faire cette étude, les positions de 40 bactéries *E. coli* soumises à une force de DEP+ (avec un signal d'amplitude 10 V<sub>pp</sub>et de fréquence 20 MHz) ont été déterminées toutes les 330ms entre le centre des électrodes (leur position de départ) et l'interface gap-électrode la plus proche (leur position finale). Les vitesses moyennes entre deux images successives sont représentées figure 7.17. Chaque couleur correspond à une bactérie différente, suivie entre le centre des électrodes.

Plus la bactérie s'approche de l'interface, plus sa vitesse augmente, et la cadence de prise d'image ne nous permet pas de déterminer la vitesse des bactéries lorsqu'elles se rapprochent à plus de  $20\mu m$ de ces interfaces. Pour avoir accès à ces données, il faudrait utiliser une cadence plus rapide, ce qui imposerait aussi un traitement de données plus lourd. Cependant ces données sont suffisamment précises pour nous permettre d'affirmer que l'évolution de la vitesse expérimentale des bactéries se superpose parfaitement à l'évolution de la composante horizontale de  $\nabla |E|^2$  (courbe rouge sur la figure 7.17). Cette superposition confirme bien la relation de proportionnalité entre vitesse et gradient de champ dans notre microsystème, et permet donc de conclure que la DEP est bien la force dominante qui met les cellules en mouvement dans le microsystème.

En effet, lorsqu'on applique un champ électrique non-uniforme, les forces de DEP ne sont pas les seules à pouvoir mettre en mouvement les cellules. En particulier les forces d'électro-osmose et les effets électro-thermiques font très souvent l'objet de discussions dans la littérature [Oh et al., 2009] [Ramos et al., 1998]. Cette étude nous permet de valider que dans nos conditions expérimentales, ces forces sont négligeables devant les forces de DEP.



FIGURE 7.17 – Superposition de l'évolution de la vitesse horizontale de *E. coli* mesurée expérimentalement en fonction de la position des bactéries dans le micro-système (chaque couleur correspond à la trajectoire d'une bactérie différente) avec la composante horizontale de  $\vec{\nabla}|E|^2$  à une hauteur de 2µm au-dessus des électrodes (courbe rouge).

En outre, à partir de l'égalité 7.11, on peut déterminer une expression théorique de la partie réelle du facteur CM :

$$Re[\underline{f}_{CM}] = \frac{6\pi r\eta |\vec{v}|}{2\pi\epsilon_0 \epsilon_{ext} r^3 |\vec{\nabla}|E|^2|}$$
(7.15)

Avec nos conditions expérimentales, si l'on approxime la bactérie *E. coli* par une sphère de rayon 0.75 $\mu$ m, Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] pour une bactérie dans nos conditions expérimentales vaut alors 0.1.

Ce jeu de paramètres (taille et  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$ ) sera retenu pour la suite, notamment pour une modélisation plus précise de l'intensité de la force de DEP qui guide les trajectoires des micro-organismes lorsqu'un débit est imposé dans le microsystème (section 9.1).

## 7.5 Conclusion

Cette étude a permis de poser les bases d'un modèle numérique pour évaluer des forces de DEP générées par un réseau d'électrodes interdigitées en utilisant une méthode de résolution par éléments finis, et a démontré la corrélation entre ces résultats numériques et le comportement expérimental des cellules biologiques.

Ces travaux confirment le potentiel des forces de DEP pour capturer efficacement des microorganismes dans un échantillon de sang dont l'osmolarité et la conductivité ont été modifiées.

#### Chapitre 7. Capture de cellules sanguines et de micro-organismes par DEP sans flux

La concordance entre les résultats expérimentaux et les résultats numériques est particulièrement encourageante, et permet d'envisager l'utilisation de la modélisation numérique comme un outil prédictif pour l'optimisation des paramètres du micro-système pour garantir une capture la plus efficace possible. La section 8 est consacrée à cette optimisation.

# 8 Optimisation du microsystème de capture par diélectrophorèse

Ce chapitre détaille l'influence de différents paramètres intrinsèques du microsystème sur la force de DEP, et plus particulièrement la couche de passivation, la hauteur du canal et la structure du réseau d'électrodes interdigitées.

Après avoir confirmé que les résultats du modèle numérique utilisé dans le chapitre précédent étaient en accord avec les résultats expérimentaux, nous allons utiliser les simulations numériques comme un outil prédictif pour étudier l'influence de certains paramètres sur la force de DEP, en particulier la couche de passivation et la hauteur du microsystème. La structure du réseau d'électrodes est un élément important à étudier pour améliorer la force de capture dans le canal : nous avons étudié son influence à la fois expérimentalement et à l'aide de simulations.

# 8.1 Influence de la couche de passivation

Le réseau d'électrodes est recouvert d'une couche de passivation, ce qui permet de minimiser les réactions électro-chimiques entre les électrodes et le milieu biologique, et donc d'utiliser le microsystème plus longtemps.

La présence de cette couche de passivation au-dessus des électrodes ne peut pas être négligée lorsque l'on souhaite étudier la répartition du champ électrique dans le milieu biologique au sein de la chambre de séparation. En effet, cette couche de passivation peut être modélisée comme un condensateur : à basse fréquence, le champ s'y concentre et n'est pas transmis dans le milieu biologique ; à haute fréquence, le champ y est nul et la couche de passivation est court-circuitée. Elle joue donc un rôle important dans la répartition du champ électrique, en faisant notamment intervenir la fréquence du signal électrique comme paramètre primordial.

Pour l'étude de l'influence de cette couche de passivation, nous allons utiliser un modèle analytique et un modèle numérique, puis comparer ces deux approches.

#### 8.1.1 Etude en utilisant un modèle analytique

On peut modéliser le dispositif microfluidique comme un circuit électrique composé de résistances et de capacités en série et en parallèle (figure 8.1). A partir de cette modélisation, il est possible d'établir la fonction transfert de ce dispositif afin d'évaluer l'influence de la couche de passivation sur l'intensité du champ électrique au sein du liquide biologique. Cette fonction transfert  $H(\omega)$  est calculée comme le rapport entre la tension appliquée directement sur les électrodes et la tension effectivement transmise au milieu biologique (équation 8.2).



FIGURE 8.1 – Modélisation électrique du dispositif microfluidique : son comportement peut être assimilé à celui d'un filtre passe-haut.

$$H(j\omega) = \frac{E_{milieu\ biologique.d}}{U_{au\ niveau\ des\ électrodes}} = \frac{Z_m}{Z_m + 2Z_p}$$
(8.1)

avec 
$$Z_m = \frac{R_m}{1 + jR_mC_m\omega}$$
,  $Z_p = \frac{1}{jC_p\omega}$ ,  $R_m = \frac{1}{\sigma_m} \cdot \frac{l_{gap}}{h_m \cdot w_m}$ ,  $C_m = \epsilon_m \frac{h_m \cdot w_m}{l_{gap}}$  et  $C_p = \epsilon_p \frac{h_p \cdot w_p}{e_p}$ 

où les indices p et m correspondent respectivement à la couche de passivation et au milieu biologique,  $e_p$  représente l'épaisseur de la couche de passivation,  $h_m$ ,  $h_p$ ,  $w_m$  et  $w_p$  les hauteurs et largeurs caractéristiques du canal microfluidique et de la couche de passivation et  $l_{gap}$  le chemin moyen parcouru par le champ électrique entre deux électrodes, que l'on suppose égal à la distance entre deux électrodes.

En substituant les expressions de  $Z_m$  et de  $Z_p$  dans l'équation 8.2, on obtient l'équation développée 8.2.

$$H(j\omega) = \frac{\frac{C_p R_m}{2} j\omega}{1 + \frac{R_m C_m}{2} (2 + \frac{C_p}{C_m}) j\omega}$$
(8.2)

138

Cette équation du premier ordre est l'équation d'un filtre passe haut : les expressions de la fréquence de coupure  $f_c$  et du gain  $G_0$  de ce filtre induit par la couche de passivation sont détaillées dans l'équation 8.3.

$$f_c = \frac{\sigma_m}{2\pi\epsilon_0\epsilon_m} \frac{2}{2+\alpha} \text{ et } G_0 = \frac{\alpha}{2+\alpha}$$
(8.3)

avec 
$$\alpha = \frac{\iota_{gap} c_p}{c_m c_p}$$
 (8.4)

Dans un comportement idéal, la fréquence de coupure  $f_c$  permet de séparer deux types de fonctionnement du circuit en fonction de la fréquence du signal appliqué. Lorsque la fréquence est inférieure à la fréquence de coupure, le champ électrique est concentré dans la couche de passivation et rien n'est transmis dans le milieu biologique. Inversement, lorsque la fréquence est supérieure à la fréquence de coupure, la couche de passivation est court-circuitée et le champ est alors transmis dans le milieu biologique, pondéré par un facteur égal à la valeur du gain  $G_0$ .

Ce comportement fréquentiel de la couche de passivation n'est pas indépendant du reste du circuit, et dépend notamment de la conductivité du milieu biologique. La figure 8.2 montre l'évolution de la fréquence de coupure de la couche de passivation en fonction de la conductivité du milieu.

Dans les expériences précédentes, nous avons principalement utilisé deux catégories d'échantillons :

- des échantillons à base d'eau déionisée, dont la conductivité vaut environ 0,1 mS.m<sup>-1</sup> (sections 7.3.2 et 7.3.3)
- et des échantillons obtenus à partir d'une suspension de globules rouges, dont la conductivité vaut environ 10mS.m<sup>-1</sup> (section 7.3.4).

Le tableau 8.1 récapitule les différents paramètres utiles pour le calcul de la fréquence de coupure et du gain dans chacun des deux cas considérés ci-dessus.

Tableau 8.1 – Paramètres expérimentaux utilisés pour calculer la fréquence de coupure et le gain du micro-système modélisé comme un filtre passe-haut.



Dans le cas des échantillons obtenus à partir d'une suspension de globules rouges, la fréquence de coupure se situe autour de 700 kHz, ce qui permet de confirmer que le champ électrique n'est que faiblement atténué par la couche de passivation pour les expériences décrites section 7.3.4 avec un signal électrique de fréquence 20 MHz. Pour toutes les expériences avec des échantillons beaucoup moins conducteurs à base d'eau déionisée (décrites sections 7.3.2 et 7.3.3), la fréquence de coupure



FIGURE 8.2 – Evolution de la fréquence de coupure en fonction de la conductivité du milieu biologique.

est encore plus faible (autour de 7 kHz) et ne perturbe pas nos expériences. Le gain  $G_0$  quant à lui ne dépend que des caractéristiques du micro-système et garde donc la même valeur, autour de 0.7, quelle que soit la conductivité du milieu. Cependant la conductivité maximale de l'échantillon à trier pourra atteindre 70mS.m<sup>-1</sup>(condition déterminée dans la partie précédente). Dans ces conditions, la fréquence de coupure de la couche de passivation se situe dans la zone de fréquence où l'on souhaite pouvoir effectuer la séparation entre micro-organismes et cellules sanguines.

#### 8.1.2 Etude en utilisant un modèle numérique

Nous cherchons désormais à modéliser l'influence de la fréquence à l'aide du logiciel numérique, dont nous avons présenté les premières simulations dans le chapitre précédent. La fréquence du signal électrique est un paramètre important de la simulation. Ainsi nous pouvons le faire varier afin d'étudier son influence sur la répartition du champ électrique dans le micro-système.

Sans couche de passivation (figure 8.3 A), l'intensité du champ ne dépend pas de la fréquence du signal, alors qu'en présence d'une couche de passivation (figure 8.3 B), l'intensité du champ transmis dans le canal biologique est fortement dépendante de la fréquence.

On remarque les deux comportements déjà établis lors de la modélisation analytique :

- à basse fréquence, le champ électrique se concentre dans la couche de passivation et il n'y a pratiquement aucune transmission dans le milieu biologique. La force de DEP s'appliquant sur une particule dans le canal sera donc pratiquement nulle, et ce quelle que soit la valeur de son facteur de CM,
- à haute fréquence, la couche de passivation est court-circuitée, le champ électrique est presque entièrement transmis dans le milieu biologique. C'est dans cette configuration favorable qu'il sera



FIGURE 8.3 – Evolution de la répartition du champ dans le canal en fonction de la fréquence : (A) modèle sans couche de passivation et (B) modèle avec une couche de passivation de 200nm.

possible de mettre en mouvement efficacement des particules par la force de DEP.

Pour une analyse quantitative, il est possible de s'intéresser plus précisément à la répartition du champ à une hauteur fixée dans le microsystème. On peut donc tracer l'intensité du champ électrique au-dessus des électrodes pour plusieurs fréquences (figure 8.4). On retrouve bien l'évolution décrite plus haut : plus la fréquence augmente, plus le champ augmente, jusqu'à arriver à un plateau : le champ est alors égal au champ en l'absence d'une couche de passivation, pondéré par le gain du filtre. On retrouve bien le comportement 'filtre passe-haut' du microsystème précédemment décrit dans la modélisation analytique.



FIGURE 8.4 – Estimation de |E| pour différentes fréquences du signal appliqué sur le réseau d'électrodes interdigitées à une hauteur de 200nm au-dessus des électrodes.

La figure 8.5 montre l'évolution de la valeur maximale du champ électrique en fonction de la fréquence, et permet d'extraire la valeur du gain ( $G_0 = E_0/E_{ref}$ ) qui vaut 0.73 et de la fréquence de coupure (fréquence  $f_c$  pour laquelle  $E = E_0/\sqrt{2}$ ) qui vaut 500 kHz.



FIGURE 8.5 – Evolution du maximum du champ électrique en fonction de la fréquence (à une hauteur de 200nm au-dessus des électrodes).

#### 8.1.3 Comparaison des résultats des modèles analytique et numérique

Lorsque que l'on compare les résultats des modèles analytique et numérique sur le plan qualitatif, on observe que les deux modèles prévoient un comportement du système en filtre passe-haut en fréquence. Sur le plan quantitatif, il est intéressant de noter que la prédiction des deux paramètres clés du filtre (sa fréquence de coupure et son gain) est similaire pour les deux approches. Pour le modèle analytique, le gain vaut 0.7 et la fréquence de coupure 670 kHz, alors que pour le modèle numérique, le gain vaut 0.73 et la fréquence de coupure 500 kHz.

#### 8.1.4 Conclusion

Pour résumer, afin d'effectuer un tri le plus performant possible (donc avec la force de DEP la plus intense possible), il faut utiliser un signal de fréquence plus élevée que la fréquence de coupure du microsystème. Cette fréquence de coupure devra être calculée en fonction de la conductivité du milieu biologique. Dans le cas où une fréquence plus faible devrait être appliquée (ça sera notamment le cas lorsque la conductivité de l'échantillon à trier sera de l'ordre de 70 mS.m<sup>-1</sup>), la force de DEP sera moins efficace. Pour pallier la diminution d'intensité du champ électrique à cause de la couche de passivation, il faudra envisager par exemple d'augmenter la tension aux bornes des électrodes, ou de diminuer la hauteur de la couche de passivation pour modifier la valeur de sa fréquence de coupure. Pour la fabrication du nouveau microsystème, nous déposerons donc une couche de passivation un peu moins épaisse que 200nm, soit 150nm.

# 8.2 Optimisation de la hauteur du microsystème

On s'intéresse ici à l'influence de la hauteur du canal mirofluidique sur la force de DEP.

#### 8.2.1 Simulation numérique

A partir de la simulation du champ électrique sur une section du canal, il est possible de représenter l'évolution de ce champ à une hauteur donnée des électrodes. En comparant les intensités du champ électrique pour plusieurs hauteurs au-dessus de la couche de passivation (figure 8.6 A), on constate que ce champ décroit très rapidement lorsque l'on s'éloigne des électrodes (son intensité diminue pratiquement d'un facteur 10 lorsque l'on passe de 2µm à 50µm de haut).

Mais puisque la force de DEP dépend du gradient de champ, il convient plutôt de s'intéresser à l'évolution de  $\nabla |E|^2$  à différentes hauteurs au-dessus de la couche de passivation (figure 8.6 B). La norme de  $\nabla |E|^2$  diminue d'un facteur 10<sup>3</sup> lorsque l'on passe d'une hauteur de 2µm à 50µm. La hauteur maximale à laquelle les particules se trouvent dans le canal microfluidique aura donc une influence capitale sur la capacité de capture du microsystème.

Chapitre 8. Optimisation du microsystème de capture par diélectrophorèse



FIGURE 8.6 – Estimation du champ E (A) et  $\nabla |E|^2$  (B) pour différentes hauteurs au-dessus de la couche de passivation (fréquence = 100MHz).

#### 8.2.2 Lois d'échelle

Cette forte dépendance de la hauteur dans l'intensité de la force de DEP peut aussi être déterminée par un raisonnement analytique. En effet notre système d'électrodes peut être approximé par un modèle où l'on suppose que 2 électrodes sont infiniment proches l'une de l'autre. Ce modèle, détaillé par [Ramos et al., 1998] et illustré figure 8.7, permet d'obtenir une formule analytique du champ électrique *E* :

$$E = \frac{V}{\pi r}$$
(8.5)

où *r* est la distance entre le point où le champ est calculé et l'espace inter-électrodes (en m) et *V* le potentiel électrique (en V).

Puisque le champ *E* s'exprime en 1/r, le gradient de  $E^2$  s'exprimera en  $1/r^3$ . On retrouve alors bien l'influence très forte de la hauteur sur l'intensité de la force de DEP.



FIGURE 8.7 – Schéma représentant la disposition des électrodes et la direction du champ E dans le modèle analytique présenté par [Ramos et al., 1998].

#### 8.2.3 Bilan

Un microsystème de plus de quelques dizaines de microns de haut sera donc pratiquement inefficace pour une capture de particules en flux continu. En effet au-delà de quelques dizaines de microns, les particules sont soumises à une force de DEP qui ne sera plus suffisamment intense pour contrecarrer le mouvement des cellules imposée par l'écoulement.

Il convient donc de faire un choix de hauteur comme un compromis entre l'efficacité de la capture (moins le canal sera haut, plus l'efficacité de capture sera élevée) et le débit dans le microsystème (plus le canal sera haut, plus le débit sera élevé). Le contenu des échantillons biologiques que nous souhaitons analyser nous oblige néanmoins à conserver une hauteur suffisamment importante pour que toutes les cellules sanguines puissent circuler dans le canal sans risquer de le colmater (en particulier les globules blancs peuvent atteindre plus de 20µm de diamètre). Ainsi pour la suite, la hauteur du canal du microsystème sera fixée à 30µm, comme un compromis entre l'efficacité de la force de DEP, le débit, et la possibilité de traiter des échantillons biologiques.

# 8.3 Fabrication de microsystèmes avec différents réseaux d'électrodes

La dernière étape de l'optimisation du microsystème qui sera utilisé pour capturer et concentrer les micro-organismes par DEP est l'étude de la structure du réseau d'électrodes interdigitées. Pour cela, en plus d'une étude numérique, nous souhaitons tester expérimentalement différents réseaux, avec des tailles d'électrodes et des gaps de dimension variable. Nous avons donc fabriqué des microsystèmes en prenant en compte les optimisations précédentes, mais en y intégrant 8 réseaux d'électrodes différents. Le réseau le plus performant sera sélectionné pour la validation des performances en flux du microsystème dans le prochain chapitre.

#### 8.3.1 Architecture des microsystèmes

L'architecture de ce lot permet de faire passer un écoulement au-dessus des électrodes dans un canal de 30µm de haut et d'1mm de large (figure 8.8 A). Huit réseaux d'électrodes sont gravés sur chaque microsystème, avec des électrodes de 10 à 100µm espacées de 10 à 100µm. La figure 8.8 B illustre les



différents paramètres des 8 réseaux d'électrodes gravés. Chaque réseau est composé de 10 électrodes.

FIGURE 8.8 – Architecture des microsystèmes : (A) Schéma représentant le canal microfluidique au-dessus des 8 réseaux d'électrodes. (B) Récapitulatif des différents paramètres des réseaux d'électrodes.

#### 8.3.2 Fabrication

Ces microsystèmes ont été fabriqués à la PTA (Plateforme Technologie Amont), qui est un ensemble de salles blanches au CEA offrant un environnement versatile pour fabriquer des microsystèmes sur des plaques de silicium de 100mm.



FIGURE 8.9 – Structure des microsystèmes.

Des couches de chrome (50nm) et d'or (200nm) sont déposées par pulvérisation cathodique sur une couche d'oxyde thermique de silicium. Les électrodes y sont gravées après une étape de photolithographie.

146



FIGURE 8.10 – (A) Schéma des différents niveaux de masque (B) Photographie de la plaque à la fin de la fabrication en salle blanche et après découpe.

Une couche de nitrure de silicium de 150nm d'épaisseur est ensuite déposée sur le wafer, puis ouverte au niveau de la reprise de contact. Des trous sont gravés à travers le silicium par DRIE pour réaliser les entrées et les sorties fluidiques des puces. Une couche de 30µm d'ordyl (film sec de résine photosensible) est ensuite laminée sur le wafer, puis structurée par photolithographie pour former les canaux microfluidiques.

Pour finir, les microsystèmes sont recouverts par un wafer de verre de 200 $\mu$ m d'épaisseur scellé par sérigraphie. Cette méthode consiste à déposer de la colle activable aux UV au travers d'un maillage afin d'obtenir une épaisseur de colle de quelques  $\mu$ m sur le substrat. Le maillage peut être bouché à certains endroits pour que la colle ne se dépose pas au fond des canaux mais uniquement sur l'ordyl pendant cette opération.

La figure 8.9 illustre l'empilement des différentes couches durant la fabrication. La figure 8.10 montre un schéma des microsystèmes ainsi qu'une photo de la plaque de silicium à la fin de la fabrication, après découpe.

# 8.4 Influence de la structure du réseau d'électrodes interdigitées sur la force de DEP

On souhaite pouvoir comparer l'influence de la structure des différents réseaux pour déterminer celui qui sera le plus performant pour permettre la capture des micro-organismes par DEP.

#### 8.4.1 Influence de la largeur du gap

#### 8.4.1.1 Etude numérique

De la même manière que précédemment pour déterminer la hauteur optimale du microsystème, on s'intéresse à l'évolution de  $\nabla |E|^2$  dans le modèle numérique pour comparer entre eux les réseaux pour lesquels la largeur des électrodes varie de 10 à 100µm (figure 8.11).



FIGURE~8.11 – Evolution de la norme du gradient de champ à  $5\mu m$  au-dessus des électrodes pour un gap de 10, 20, 50 ou 100 $\mu m.$ 

L'intensité de  $\nabla |E|^2$  chute très rapidement lorsque la taille du gap augmente (le maximum diminue d'un facteur 2 entre les gaps de 10 et 20µm, et d'un facteur 20 entre les gaps de 10 et 100µm). La force la plus intense dans le canal microfluidique est donc obtenue avec le réseau d'électrodes qui a un gap le plus petit possible.

#### 8.4.1.2 Etude expérimentale

**Stratégie** Afin de comparer expérimentalement les différents réseaux, on s'intéresse à la vitesse de différents micro-organismes lorsqu'ils sont soumis à une force de DEP+, en l'absence de flux. En effet, nous avons conclu précédemment (section 7.4.2) que la vitesse des particules était bien proportionnelle à la force de DEP. Ainsi, si l'on compare les vitesses de particules soumises à des forces de DEP+ créées par des réseaux différents, on sera capable de déterminer quel réseau permet d'obtenir la force de DEP la plus intense.

**Expériences** La fabrication des microsystèmes utilisés pour ces expériences a été décrite dans la section précédente. Les trois micro-organismes du modèle biologique seront utilisés pour cette

validation expérimentale, pour permettre la sélection du réseau le plus performant sur une grande variété de micro-organismes. Les échantillons sont préparés selon le protocole décrit en annexe A et resuspendus dans de l'eau déionisée, pour garantir une faible conductivité (autour de 0.1 mS.m<sup>-1</sup>).

Une fois l'échantillon injecté dans le microsystème, aucun débit n'est imposé dans le canal, pour mesurer la vitesse des micro-organismes lorsqu'ils sont soumis uniquement aux forces de DEP.



FIGURE 8.12 – Vitesse horizontale mesurée expérimentalement pour 18 bactéries *E. coli* sur 4 réseaux d'électrodes différents, avec un gap mesurant  $10\mu m$  (A),  $20\mu m$  (B),  $50\mu m$  (C) et  $100\mu m$  (D).

Pour chacun des 4 réseaux dont la taille du gap varie entre 10 et 100µm, on suit la trajectoire de 18 micro-organismes (pour chaque espèce) soumis à une force de DEP+ (fréquence du signal : 1 MHz). Les micro-organismes ont été alignés au préalable au centre des électrodes sous l'effet des forces de DEP- (fréquence du signal : 100 kHz). Pour suivre leur déplacement, on enregistre la position des micro-organismes dans le canal à une cadence de 3 images/seconde. L'évolution de ces positions dans le temps nous permet de déterminer la trajectoire des cellules et leur vitesse moyenne entre 2 images successives.

La figure 8.12 rassemble les résultats obtenus sur les bactéries E. coli, et la même expérience a été

#### Chapitre 8. Optimisation du microsystème de capture par diélectrophorèse

réalisée sur *C. albicans* et *S. epidermidis*. Comme précédemment, il n'est pas possible de connaître la vitesse des cellules lorsqu'elles s'approchent trop près de l'interface gap-électrode, puisque leur vitesse augmente brutalement. Afin d'analyser les résultats, on s'intéresse donc à la vitesse des cellules lorsqu'elles arrivent à mi-chemin entre le centre des électrodes (leur point de départ) et l'interface gap-électrode la plus proche (leur point d'arrivée). Cela revient à comparer la valeur de  $\nabla |E|_x^2$  des différents réseaux à mi-chemin entre le centre et le bord d'une électrode.



FIGURE 8.13 – Vitesses à mi-chemin entre le centre et le bord des électrodes des 3 micro-organismes pour les 4 réseaux d'électrodes différents dont le gap varie entre 10 et  $100\mu m$ .

La figure 8.13 résume les valeurs des vitesses à mi-chemin en fonction de la taille du gap du réseau pour chacun des 3 micro-organismes du modèle biologique. Les vitesses pour les gaps de 10 et  $20\mu m$ sont pratiquement équivalentes, alors qu'elles diminuent fortement pour les deux autres dimensions. Ces expériences confirment bien la tendance donnée par les simulations : plus le gap est petit, plus la force de DEP sera élevée, et donc plus la capture sera efficace en flux.

#### 8.4.1.3 Conséquence sur la viabilité des micro-organismes

On peut donc conclure de l'étude précédente que plus le gap du réseau est faible, et plus la force de DEP est intense. En faisant abstraction des difficultés de fabrication que cela imposerait, on peut se demander s'il existe une valeur minimale pour le gap, ou bien si les électrodes peuvent être infiniment proches l'une de l'autre.

Le fait de diminuer le gap entre les électrodes permet d'obtenir un gradient plus intense, mais avant tout un champ plus intense. La figure 8.14 illustre l'évolution du champ maximal à 1 $\mu$ m au-dessus des électrodes en fonction de la taille du gap. Cette valeur correspond à l'intensité du champ à laquelle les micro-organismes seront exposés lorsqu'ils seront concentrés dans la zone de capture de DEP+.

A trop forte intensité, le champ peut avoir un effet létal sur les micro-organismes. En particulier, une

étude récente a démontré que la capture dans une zone de DEP+ des bactéries *E. coli* avec un champ d'intensité supérieur à 7 10<sup>5</sup> V.m<sup>-1</sup> pouvait altérer la viabilité de ces micro-organismes [Donato et al., 2013].



FIGURE 8.14 – Valeur du champ électrique maximal à 1 $\mu$ m au-dessus des électrodes pour différents gaps (obtenues par simulation numérique avec un signal d'amplitude 10 V<sub>pp</sub> et de fréquence 10 MHz). La ligne rouge correspond à la valeur du champ électrique à ne pas dépasser pour conserver les micro-organismes viables pendant la capture [Donato et al., 2013].

Nous reviendrons plus longuement sur l'influence de l'intensité du champ sur la viabilité des microorganismes dans le prochain chapitre, mais ces données démontrent que le gap entre les électrodes de notre microsystème ne devra pas dépasser 10µm, puisque la viabilité des micro-organismes après capture est un critère important dans la mise au point de la méthode de tri.

#### 8.4.2 Influence de la largeur des électrodes

On effectue le même raisonnement que précédemment pour déterminer la valeur de la largeur des électrodes qui permettra d'obtenir une force de DEP la plus intense possible. La figure 8.15 illustre l'évolution de la norme de  $\nabla |E|^2$  pour différentes largeurs d'électrodes, à 5µm au-dessus du réseau.

On constate que la taille des électrodes n'a aucune influence sur la distribution de la force de DEP. Nous choisirons donc arbitrairement 100µm pour la suite de l'étude.



FIGURE 8.15 – Evolution de la norme de  $\nabla E^2$  à 5µm au-dessus des électrodes pour 4 réseaux dont la taille des électrodes varie.

# 8.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc étudié l'influence des différents paramètres du microsystème à l'aide de simulations numériques et d'expériences incluant les trois micro-organismes du modèle biologiques. Ces travaux nous ont permis de déterminer les paramètres optimaux pour fabriquer un microsystème en fonction des deux critères auxquels la méthode de tri doit répondre, à savoir être la plus efficace possible et conserver la viabilité des micro-organismes.

Le nouveau microsystème sera donc constitué d'un canal de  $30\mu m$  de haut, d'une couche de passivation de  $150\mu m$  d'épaisseur, et d'un réseau d'électrodes interdigitées de  $100\mu m$  de large et espacées de  $10\mu m$ .

Le prochain chapitre détaille les performances expérimentales de ce microsystème pour le tri de micro-organismes en flux continu.

# 9 Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le microsystème optimisé

Après avoir fixé les paramètres de l'architecture des microsystèmes pour le tri cellulaire par DEP, on s'intéresse désormais à l'influence des paramètres expérimentaux, à savoir la fréquence du champ et le débit de l'échantillon. Les performances du microsystème en termes de taux de capture et de viabilité seront ensuite déterminées expérimentalement.

# 9.1 Influence du flux

Après avoir sélectionné les paramètres optimaux pour la couche de passivation (150nm), le canal microfluidique (hauteur de  $30\mu$ m) et le réseau d'électrodes interdigitées (gap de  $10\mu$ m), on peut désormais s'intéresser à l'influence du flux lors de la capture des micro-organismes. En effet, un large volume devra être traité par le microsystème, et le débit de l'échantillon dans le canal de capture aura une importance cruciale sur l'intérêt de cette étape de préparation d'échantillon pour les cliniciens. En effet, pour avoir une valeur médicale importante, cette étape devra être la plus rapide possible.

On ajoute donc au modèle précédent de COMSOL un flux laminaire dans le canal, qui transporte les micro-organismes à travers la zone de capture. La figure 9.1 illustre la trajectoire de 25 particules réparties aléatoirement le long d'une section verticale à l'entrée du canal. Les particules les plus basses se font piéger très rapidement sur les bords des électrodes, et les particules les plus hautes perdent peu à peu de l'altitude à chaque passage proche d'une interface gap-électrode. Les caractéristiques des particules sont celles déterminées auparavant section 7.4.2, c'est-à-dire r =  $0.75\mu$ m et Re[ $\underline{f}_{CM}$ ] = 0.1. L'utilisation de ces données expérimentales permet de s'approcher au plus près des caractéristiques physiques des particules biologiques que nous manipulons.

La simulation a aussi été effectuée avec des particules de tailles différentes, pour symboliser *C. albicans* (r=3µm) et *S. epidermidis* (r=0.5µm). La partie réelle du coefficient de CM est choisie égale à 0.1 dans toutes les simulations. Le nombre de micro-organismes non capturés après avoir traversé un réseau de 10 électrodes est ensuite comptabilisé. Ces données sont détaillées figure 9.2, pour différentes vitesses moyennes de l'échantillon dans la zone de capture.

# Chapitre 9. Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système optimisé



FIGURE 9.1 – Trajectoire de 25 particules soumises aux forces de DEP et entrant dans le micro-canal à différentes vitesses moyennes (seules les 3 premières électrodes sont représentées ici).



FIGURE 9.2 – Rendement de capture théorique en fonction du micro-organisme et de la vitesse du flux dans la zone de capture.

Cette simulation met parfaitement en évidence que la force de DEP est une force volumique : plus une particule est grosse et plus la force de DEP est intense. Ainsi, quelle que soit la valeur de la vitesse sur la plage de valeurs simulées, les levures *C. albicans* se font toujours capturer avant la fin du réseau. Les bactéries symbolisées par des sphères de 1 $\mu$ m de diamètre seront les moins sensibles aux forces de DEP. Cette dépendance en fonction de la taille a aussi été mise en évidence expérimentalement section 8.4.1.2, où l'on constate déjà sur la figure 8.13 que les vitesses mesurées expérimentalement pour *C. albicans* sont nettement supérieures à celles de *E. coli* et de *S. epidermidis*.

#### 9.2. Choix de la fréquence pour effectuer une capture générique des micro-organismes

La vitesse d'entrée des micro-organismes doit être choisie comme un compromis entre une efficacité de capture élevée et un débit important. En effet, plus les particules arrivent avec une vitesse élevée, et moins la capture sera efficace. Ces simulations permettent d'envisager de fixer une vitesse moyenne raisonnable entre 100 et  $200 \mu m.s^{-1}$ . Dans un microsystème de  $30 \mu m$  de haut et d'1 mm de large, le débit sera alors de 10 à  $20 \mu L.h^{-1}$ .

# 9.2 Choix de la fréquence pour effectuer une capture générique des microorganismes

#### 9.2.1 Comportement diélectrophorétique des différents types cellulaires

Afin de déterminer expérimentalement la fréquence optimale du signal qui permettra une capture générique de tous les micro-organismes par DEP+, nous avons étudié le comportement des différents types cellulaires (les 3 micro-organismes du modèle biologique choisi, et les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes) dans un échantillon sanguin dilué par 20 avec de l'eau déionisée, sur une large gamme de fréquence (entre 100 kHz et 50 MHz).

Les résultats de ces expérience sont présentés dans le tableau 9.1. Pour donner un exemple, la figure 9.3 illustre la position des plaquettes avec un signal de fréquence 1MHz.

Tableau 9.1 – Comportement diélectrophorétique des micro-organismes et des cellules sanguines en fonction de la fréquence du champ électrique.

	100 kHz	200 kHz	500 kHz	1 M Hz	2 M Hz	5 M Hz	10 M Hz	20 M Hz	50 M Hz
E. coli	-	-	++	++++	++++	+++	+++	+++	++
C. albicans			+	+++	++++	++++	+++	++	++
S. epidermidis	rien	rien	rien	+	+	++	++	rien	rien
GR perméabilisés				-/ +	-/ +	-/+	-	-	rien
plaquettes perméabilisées					-	-	-	rien	rien
GB perméabilisés	-	-	-	-	-	-	rien	rien	rien

Les signes + ou - permettent de déterminer si les cellules se déplaçent dans la zone de capture de DEP + ou de DEP -. Le nombre de symboles permet de noter de manière qualitative la vitesse de déplacement des cellules, donc l'amplitude de la force. Le symbole -/+ est utilisé lorsqu'une partie des cellules rejoint la position d'équilibre de DEP+ et l'autre partie celle de DEP-. Ce cas s'est présenté uniquement pour les globules rouges perméabilisés.

Ce tableau comparatif permet de choisir une fréquence entre 1 et 10 MHz pour garantir une capture générique des micro-organismes par DEP+ tout en soumettant les cellules sanguines perméabilisées à une force de DEP-.

Chapitre 9. Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système optimisé



FIGURE 9.3 – Déplacement dans la zone de DEP- des plaquettes avec un signal de fréquence 1MHz.

#### 9.2.2 Comparaison entre les simulations et les valeurs expérimentales

Les expériences précédentes permettent de déterminer une valeur caractéristique du comportement diélectrophorétique des cellules : la valeur de la fréquence pour laquelle le signe de  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  s'inverse, ce qui se traduit expérimentalement par un changement de positions d'équilibre des cellules. Cette valeur se situe par exemple entre 200 et 500 kHz pour *E. coli* et *C. albicans* : au-delà de cette fréquence, les micro-organismes sont soumis à une force de DEP+.

Pour les globules rouges perméabilisés, on peut déterminer 2 valeurs pour lesquelles  $\text{Re}[\underline{f}_{CM}]$  change de signe. Il existe donc un intervalle de fréquence dans lequel les cellules seront soumises à une force de DEP+ très faible : expérimentalement cet intervalle s'étend entre 1 et 5 MHz. Néanmoins, comme discuté précédemment section 9.2.1, la majeure partie des globules rouges reste toujours soumise à une force de DEP-, quelle que soit la fréquence.

On peut alors superposer l'évolution théorique de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  déterminée dans le chapitre précédent et les valeurs expérimentales de ces fréquences de changement pour *E. coli, C. albicans* et pour les globules rouges lysés, afin de vérifier l'adéquation entre simulation et expériences. La figure 9.4 permet ainsi de démontrer que les résultats expérimentaux concordent bien avec les prédictions théoriques obtenues à la fin de la partie III.



FIGURE 9.4 – Comparaison entre l'évolution théorique de la partie réelle du facteur CM et les valeurs expérimentales des fréquences de changement (croix rouges) pour une bactérie *E. coli* (A), une levure *C. albicans* (B) et un globule rouge perméabilisé (C). Les paramètres utilisés pour tracer les évolutions de  $\text{Re}[\underline{f}_{\text{CM}}]$  sont détaillés dans la partie III. Les caractéristiques du milieu biologique sont celles d'une dilution par 20 d'un échantillon sang dans de l'eau distillée.

#### 9.2.3 Validation expérimentale

Afin de vérifier la possibilité de piéger simultanément les trois micro-organismes du modèle biologique, une expérience de capture a été réalisée avec un échantillon sanguin dilué 20 fois contenant à

# Chapitre 9. Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système optimisé

la fois *E. coli, S. epidermidis* et *C. albicans*. La figure 9.5 illustre la capture des 3 micro-organismes dans les zones de capture en DEP+, avec un signal de fréquence 10 MHz et d'amplitude 10V<sub>pp</sub>.



FIGURE 9.5 – Capture générique de *E. coli, S. epidermidis* et *C. albicans* dans les zones de capture par DEP+ avec un signal d'amplitude 10V<sub>pp</sub>et de fréquence 10 MHz.

Cette expérience permet de valider le principe d'une capture générique par DEP de micro-organismes dans un échantillon sanguin.

# 9.3 Extraction des micro-organismes dans un échantillon sanguin

L'étape finale de cette étude est de caractériser expérimentalement l'efficacité de capture des microorganismes à partir d'un échantillon de sang en utilisant un microsystème dont les paramètres géométriques ont été optimisé dans le chapitre 8 (hauteur, largeur des électrodes, espace entre les électrodes) et avec les paramètres expérimentaux optimisés ci-dessus (vitesse linéaire et fréquence du signal). Le tableau 9.2 récapitule ces différents paramètres.

Tableau 9.2 – Résumé des paramètres géométriques du microsystème optimisés dans le chapitre 8 et des paramètres expérimentaux optimisés ci-dessus.

hauteur	largeur	longueur	fréquence	vitesse linéaire
du canal	du gap	des électrodes	du signal	moyenne
30µm	10µm	sans influence (100µm)	1-10 MHz	$100-200 \mu m. s^{-1}$

## 9.3.1 Préparation des échantillons

Les échantillons biologiques utilisés pour la validation des performances du microsystème sont des échantillons de sang dilués par 20 avec de l'eau déionisée (pour simuler la sortie de l'échantillon après le premier module) contenant des bactéries *E. coli* à une concentration d'environ 10<sup>6</sup> ufc/mL pour les expériences qualitatives et 10<sup>4</sup> ufc/mL pour les expériences quantitatives. Cette concentration est beaucoup plus élevée que la concentration initiale des échantillons cliniques, mais nous permet d'obtenir des résultats statistiques plus pertinents.

## 9.3.2 Description du banc expérimental

Comme pour les expériences d'acoustophorèse, l'échantillon biologique est injecté dans le microsystème à l'aide d'un contrôleur en pression (Fluigent). Les connections fluidiques se font à nouveau en face arrière du substrat, côté silicium, pour ne pas encombrer la face supérieure du microsystème, ce qui permet une observation au microscope de tout le canal. Pour permettre l'étanchéité à l'entrée et la sortie du microsystème, un joint torique placé autour d'un tube épanoui est comprimé contre le microsystème qui est maintenue dans une pièce plastique, elle-même emboîtée dans un montoir en aluminium (figure 9.6).



FIGURE 9.6 – Montage pour assurer les connections fluidiques (par-dessous) et les connections électriques

Ce système permet d'éviter l'utilisation de pièces intermédiaires entre les capillaires et le microsystème. En effet, pour des raisons de sécurité et pour assurer le confinement des risques biologiques, tous les objets directement en contact avec les échantillons sanguins doivent être à usage unique ou doivent être désinfectés après chaque expérience. Grâce à ce montage, aucune pièce du banc autre que le joint torique, le tube et le microsystème n'est en contact avec l'échantillon. Ce banc permet aussi d'assurer les contacts électriques à l'aide d'un peigne fixé sur le montoir en aluminium.

La sédimentation des cellules dans les échantillons biologiques est évitée en utilisant un agitateur magnétique pour mélanger en continu le mélange avant qu'il n'entre dans le microsystème.

Le microscope équipé d'un objectif 20x (Zeiss LD Epiplan) permet de couvrir un champ de 430 x  $328 \ \mu m^2$ . Comme ce champ ne permet pas de couvrir toute la zone de capture des micro-organismes, il est possible de programmer les déplacements de la platine sur laquelle se trouve le montage et de les synchroniser avec la caméra pour obtenir une image complète de la zone de capture.

## 9.3.3 Résultats qualitatifs d'extraction

La figure 9.7 illustre une partie de la zone capture observée au miscroscope pendant l'écoulement de l'échantillon et avec un signal électrique d'amplitude 10 V<sub>pp</sub>et de fréquence 10 MHz. La vitesse moyenne de l'écoulement est de 100  $\mu$ m.s<sup>-1</sup>. Les bactéries sont capturées dans la zone de capture par DEP+, alors que les cellules sanguines perméabilisées sont soumises à des forces de DEP-, qui sont beaucoup moins intenses que les forces de DEP+ : les cellules sont donc entraînées par l'écoulement vers la sortie.

Une fois capturées et concentrées dans les zones de capture de DEP+, il suffit de couper le signal électrique pour que les bactéries soient emportées par le flux. On récupère alors en sortie une solution concentrée, contenant uniquement des bactéries. Le volume dans lequel les bactéries peuvent être récupérées dépend de la largeur du micro-système. Avec notre dispositif, la zone de capture s'étend sur 1.1mm<sup>2</sup>, ce qui représente un volume de 32 nL.

Cette expérience qualitative (nous calculerons le rendement de capture dans la section suivante) permet de mettre en évidence que ce micro-système remplit bien les objectifs fixés, à savoir extraire, concentrer et éluer les micro-organismes à partir d'un échantillon de sang.



FIGURE 9.7 – Capture des bactéries *E. coli* à partir d'un échantillon sanguin dilué par 20 dans de l'eau déionisée pendant l'application d'un signal électrique d'amplitude 10  $V_{pp}$  et de fréquence 10 MHz pendant 30 secondes. Le champ est ensuite éteint pour permettre l'élution des bactéries capturées.

#### 9.3.4 Résultats quantitatifs de capture

Pour obtenir des résultats quantitatifs sur l'efficacité de capture du micro-système, il est nécessaire de connaître le nombre de bactéries capturées et le nombre de bactéries ayant franchi la zone de capture sans y être piégées. Pour cela, il faut :

- dénombrer les bactéries piégées par observation au microscope de toute la zone de capture,
- récupérer en sortie l'échantillon sanguin contenant potentiellement les bactéries non capturées et les dénombrer par comptage sur boîte (annexe B).

On peut ainsi connaître précisément le nombre de bactéries piégées et le nombre de bactéries total de l'échantillon de départ (bactéries piégées + bactéries non piégées), pour déterminer le taux de capture du micro-système.



FIGURE 9.8 – Pourcentage de bactéries capturées en fonction du temps et du numéro du gap du réseau d'électrodes interdigitées.

Au lieu d'effectuer un seul dénombrement au microscope de la zone de capture à la fin de l'expérience, le nombre de bactéries capturées est déterminé à différents temps après le début de l'expérience, et pour chaque gap. La figure 9.8 illustre ces dénombrements pour une capture de *E. coli* à partir d'un échantillon de  $25\mu$ L, avec un signal de fréquence 10Mhz et d'amplitude  $10V_{pp}$ , pour les 4 premiers gaps (sur 9 au total) et pour l'ensemble du réseau. A noter qu'une grosse partie de l'échantillon a été injectée pendant la première heure de l'expérience, et un volume beaucoup plus faible s'est écoulé pendant la deuxième heure, ce qui explique cette cassure dans la pente des courbes. L'injection est en effet régulée en pression, et l'obtention d'un débit stable sur plusieurs heures peut devenir problématique lorsque l'on manipule des échantillons biologiques pouvant colmater certaines

parties du canal de 30µm de haut.

Les 2 premiers gaps permettent de capturer près de 50% des bactéries présentes dans l'échantillon. L'ensemble du réseau composé de 10 électrodes permet de piéger 97% des bactéries présentes dans l'échantillon.

#### 9.3.5 Résultats quantitatifs de relargage

Pour éluer les bactéries capturées dans la zone de DEP+, il suffit de couper le champ électrique : entraînées dans l'écoulement, moins 2% des bactéries *E. coli* restent adsorbées aux électrodes. Le fait de ne pas utiliser d'interaction forte entre la cellule cible et le substrat (comme un greffage d'anticorps par exemple) permet une élution simple des micro-organismes. Toutefois cette étape de relargage devra être confirmée par des expériences avec d'autres micro-organismes, notamment *S. epidermidis* qui s'adsorbe facilement aux surfaces, pour confirmer si la force d'entraînement du fluide est suffisante pour désorber les cellules. Si cela ne suffit pas, on peut imposer une force de DEPsur les micro-organismes après capture en changeant la fréquence du signal électrique (autour de 100kHz par exemple), pour les repousser par DEP du bord des électrodes. Un traitement de surface avec de la BSA peut aussi être envisagé.

# 9.4 Viabilité

Il reste encore deux paramètres expérimentaux dont l'influence n'a pas été étudiée : la tension appliquée, et le temps maximal de résidence des bactéries dans les zones de capture de DEP+. Ces deux paramètres sont particulièrement importants puisqu'ils conditionnent la viabilité des microorganismes après la capture. En effet, l'utilisation d'un champ trop intense pour la capture peut certes améliorer le rendement de capture, puisque la force sera plus intense, mais peut aussi détériorer les micro-organismes capturés. En outre, si les micro-organismes restent trop longtemps au contact de champs électriques très intenses (comme c'est le cas dans les zones de capture), le champ électrique peut perméabiliser la membrane de manière irréversible et mener à la désintégration du micro-organisme. Un compromis entre le rendement de capture et le taux de survie des micro-organismes doit donc être trouvé.

#### 9.4.1 Facteurs altérant la viabilité des micro-organismes

Notre méthode de tri expose les cellules à des champs électriques intenses. Il est donc important de comprendre comment ces champs peuvent affecter le métabolisme des cellules. Deux effets sont à considérer lorsque l'on s'intéresse à l'effet des champs électriques sur les cellules : l'augmentation de la température, et les interactions directes entre le champ et la cellule.

#### 9.4.1.1 Influence de la température

Le passage d'un courant électrique dans un milieu résistif entraîne un échauffement par effet Joule, et l'élévation de la température au sein d'un milieu biologique peut être calculée d'après l'équation de la chaleur :

$$k\nabla^2 T + \sigma_m E^2 = 0$$
(9.1)
$$d'où \Delta T \approx \frac{\sigma V_{rms}^2}{k}$$

où  $\sigma_m$  représente la conductivité du milieu (en S.m<sup>-1</sup>),  $V_{rms}$  la valeur efficace de la tension appliquée sur le réseau d'électrodes (en V) et *k* la conductivité thermique du milieu (en W.m<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>). Pour les calculs suivants, la conductivité thermique du milieu biologique est choisie égale à la conductivité thermique de l'eau (0.6 W.m<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>). L'établissement de cette relation est détaillé par Ramos [Ramos et al., 1998].

La figure 9.9 représente l'élévation de la température en fonction de l'amplitude du signal électrique, pour deux conductivités différentes, qui correspondent à la conductivité du sang et celle des échantillons utilisés au cours de nos expériences.



FIGURE 9.9 – Elévation de la température en fonction de l'amplitude du signal électrique pour des milieux ayant des conductivités de  $1.6 \text{ S.m}^{-1}$  ou 70 mS.m<sup>-1</sup>.

Dans un milieu de même conductivité que le sang, l'élévation de température peut atteindre près de 40 °C dans nos conditions expérimentales (lorsque l'amplitude du signal vaut 10  $V_{pp}$ ) : cette forte élévation serait sans doute létale pour la plupart des micro-organismes que l'on cherche à capturer. Cependant la dilution des échantillons avec de l'eau déionisée permet de diminuer la conductivité, et donc de diminuer l'échauffement. Lorsque la conductivité vaut 70 mS.m<sup>-1</sup>, la différence de température ne dépasse pas 2 °C dans nos conditions expérimentales. En pratique, puisque toutes

les expériences de capture se font à température ambiante, une élevation de 2 °C ne peut pas être significative pour la viabilité des micro-organismes, puisque leur température optimale de croissance se situe entre 30 et 37 °C.

#### 9.4.1.2 Influence du champ électrique

Pour comprendre dans quelle mesure le champ électrique peut être létal pour une cellule, il convient de revenir sur la notion d'électro-perméabilisation.

Lorsqu'une cellule et le milieu se polarisent dans un champ électrique, des charges s'accumulent de part et d'autre de la membrane cellulaire. Cette modification dans la distribution des charges donne naissance à un potentiel transmembranaire (TMP). En l'absence de champ électrique, la barrière cellulaire semi-perméable entre le cytoplasme et le milieu extérieur stabilise ce potentiel autour de -70mV. La polarisation de la cellule bouleverse cet équilibre, et la valeur du TMP peut fortement augmenter, jusqu'à conduire à l'électroporation de la membrane, à sa dégradation puis à la mort de la cellule.

Lorsque la cellule est sphérique, le TMP induit par un champ électrique alternatif peut être calculé selon la relation [Marszalek et al., 1990] [Holzapfel et al., 1982] :

$$\Delta \phi = 1.5 r E_0 \frac{\cos \theta}{\sqrt{1 + (\omega \tau)^2}}$$

$$o \tilde{u} \tau = r C_m (\frac{1}{\sigma_{int}} + \frac{1}{2\sigma_{ext}})$$
(9.2)

où  $\omega$  est la fréquence angulaire du signal électrique (en rad.s<sup>-1</sup>) ( $\omega = 2\pi f$ ),  $\sigma_{int}$  et  $\sigma_{ext}$  les conductivités du cytoplasme et du milieu extérieur (en S.m<sup>-1</sup>), r le rayon de la cellule (en m),  $C_m$  la capacité de la membrane (en F.m<sup>-2</sup>) et  $\theta$  l'angle entre la direction du champ et la droite passant par le centre de la cellule et le point de la membrane pour lequel on souhaite calculer le TMP.

Lorsque le TMP atteint une certaine valeur critique  $\Delta \phi_c$ , la membrane se perméabilise : on parle d'électroporation. A noter que le TMP n'est pas uniforme sur toute la surface de la cellule. Il est maximal aux points où  $\cos\theta = 1$ , c'était à dire dans la direction du champ. C'est précisément à ces points-là que la membrane commencera à se perméabiliser. Cette perméabilisation est réversible, mais si le TMP dépasse une valeur critique, la perméabilisation de la cellule devient irréversible et conduit à la destruction de la cellule (figure 9.10).

L'électroporation est une technique couramment utilisée dans de nombreux domaines. En particulier, en médecine ou en laboratoire, la perméabilisation transitoire de la membrane d'une cellule peut être recherchée pour transférer un gène à l'intérieur de la cellule par exemple [Neumann et al.,

(9.3)
## Chapitre 9. Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système optimisé



FIGURE 9.10 – Sous l'effet d'un champ électrique intense, la membrane d'une cellule se perméabilise. Si le champ est trop intense, cette perméabilisation devient irréversible. D'après [Puc et al., 2004]

1982]. En agroalimentaire, c'est au contraire la perméabilisation irréversible des membranes des micro-organismes qui est recherchée pour éliminer tout risque de contamination dans les aliments [Heinz et al., 2001].

Le potentiel transmembranaire critique se situe généralement entre 0.2 V [Teissie and Rols, 1993] et 1 V [Gehl, 2003]. D'après l'équation 9.3, l'intensité du champ électrique nécessaire pour perméabiliser une membrane dépend de la taille de la cellule. Pour une cellule de mammifère, le champ électrique critique est souvent estimé à  $10^5$  V. m<sup>-1</sup> [Fox et al., 2006], mais est beaucoup plus intense pour des micro-organismes et se situe alors autour de quelques  $10^6$  V. m<sup>-1</sup> [Sale and Hamilton, 1967] [Geveke and Kozempel, 2003].

Lors de la détermination des paramètres du réseau d'électrodes, nous avons déjà pris en compte cette limitation, en choisissant un gap de 10µm. Un gap plus petit aurait généré un champ trop intense pour la survie des micro-organismes. Néanmoins, les micro-organismes sont placés dans un milieu hypotonique pendant toute la durée de la capture. Nous avons pu observer précédemment que ces conditions hypotoniques, même en l'absence d'un champ électrique, perméabilisent dans une certaine mesure la membrane des micro-organismes (l'iodure de propidium peut pénétrer à l'intérieur de la cellule). On peut donc imaginer que les micro-organismes seront d'autant plus sensibles à un champ électrique intense. L'influence de l'osmolarité du milieu sur le phénomène d'électroporation a déjà été étudié pour des cellules eucaryotes [Wang and Lu, 2006], et a démontré un taux de survie plus faible suite à une exposition à un champ électrique lorsque le milieu n'est pas isotonique. Cette sensibilité accrue mériterait d'être plus amplement étudiée par la suite pour mieux comprendre l'impact du champ électrique sur la viabilité des micro-organismes pendant la capture dans notre microsystème.

En outre, l'intensité du champ n'est pas le seul critère qui peut influer sur la viabilité des microorganismes : l'effet létal du champ dépend aussi de la durée d'exposition au champ, comme nous avons pu le constater expérimentalement.

#### 9.4.2 Résultats expérimentaux

L'influence de l'amplitude du signal et du temps d'exposition sur la viabilité des micro-organismes a été étudiée en travaillant principalement avec les bactéries *E. coli* et dans une moindre mesure avec les levures *C. albicans*.

**Temps de résidence** Pour évaluer l'effet de la durée de résidence des micro-organismes dans les zones de capture en DEP+, nous avons observé ces zones à différents temps au microscope, puis dénombré sur les images le nombre de micro-organismes capturés en fonction du temps (figure 9.11). Les micro-organismes sont capturés avec un signal de fréquence 10 MHz et d'amplitude 20 V<sub>pp</sub>. L'échantillon de départ contient à la fois des bactéries *E. coli* et des levures *C. albicans*, mais dans des concentrations différentes, ce qui explique que l'on capture davantage de bactéries que de levures.



FIGURE 9.11 – Evolution du nombre de micro-organismes capturés dans la zone de capture DEP+ en fonction du temps.

Entre le début de l'expérience et 2h45, le nombre de micro-organismes capturés augmente, au fur et à mesure que l'échantillon est traité. Entre 2h45 et 3h25, ce nombre commence à chuter : cela signifie que les micro-organismes quittent la zone de capture, emportés par le flux.

Pour comprendre pourquoi ce nombre chute alors qu'il devrait continuer d'augmenter, nous avons voulu comparer l'aspect des micro-organismes piégés entre 1h50 et 3h25 (figure 9.12). Alors que les bactéries *E. coli* sont parfaitement perpendiculaires aux bords des électrodes au bout d'1h50, elles ne le sont plus aussi régulièrement au bout de 3h30, comme si la structure de la bactérie avait été endommagée. On ne peut par contre rien observer de similaire sur les quelques *C. albicans* piégées puisqu'elles sont sphériques. On peut néanmoins remarquer que pratiquement toutes les levures piégées sur la première électrode au bout d'1h50 se sont échappées de la zone de capture au bout de 3h30.

## Chapitre 9. Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système optimisé



FIGURE 9.12 – Observation d'une partie de la zone de capture après 1h50 et 3h30 de capture avec un signal de fréquence 10 MHz et d'amplitude 20 Vpp. La différence de couleur entre les deux images correspond à un réglage différent du microscope, et non pas un changement de couleur des micro-organismes.

Ces observations démontrent que l'exposition prolongée aux champs électriques affaiblit la force de DEP qui s'exerce sur les micro-organismes, qui devient alors trop faible pour s'opposer à la force d'entraînement du flux.

Pour déterminer formellement l'impact d'une exposition prolongée au champ électrique dans la zone de capture en DEP+ sur la viabilité de *E. coli*, nous avons effectué deux expériences dans les mêmes conditions (signal de fréquence 10MHz et d'amplitude 20V<sub>pp</sub>) mais en libérant les bactéries à des temps différents. Pour évaluer la viabilité des micro-organismes en sortie du micro-système, il faut :

- évaluer le nombre de micro-organismes capturés, par dénombrement à partir des observations au microscope des zones de capture,
- et évaluer le nombre de micro-organismes vivants à la sortie du micro-système, après relargage, en effectuant un comptage sur boîte.

En comparant ces deux valeurs, on peut connaître la proportion de bactéries ayant été capturées puis récupérées vivantes. Ces expériences n'ont été faites que sur *E. coli*, car la motilité de ces bactéries les empêche de s'adsorber aux parois du microsystème ou des tubes : le nombre de bactéries récupérées à la sortie correspond bien au nombre de bactéries capturées. Ce raisonnement ne serait pas forcément vrai avec des bactéries qui pourraient rester adsorbées dans les tubes ou à la surface des électrodes, comme *S. epidermidis*.

Lorsque les bactéries sont récupérées après 2h de traitement de l'échantillon, 45% sont viables, alors qu'au bout de 3h30, seulement 8% des bactéries sont viables. Cela permet de confirmer qu'un temps d'exposition prolongé au champ électrique intense qui règne dans les zones de capture en DEP+ peut être létal pour les micro-organismes. Il faut donc limiter au maximum la durée d'exposition. Lorsqu'un volume important devra être traité, il faudra privilégier la parallélisation les microsystèmes pour limiter le temps de capture plutôt que de traiter tout l'échantillon en une seule fois sur un temps plus long.

**Amplitude et fréquence du signal** La fréquence du signal électrique n'a qu'un impact modéré sur la viabilité : lorsqu'on effectue une capture de 2h avec un signal d'amplitude  $20 V_{pp}$ , le taux de survie des micro-organismes est de 45% pour une fréquence de 10 Mhz, et de 56% pour une fréquence de 1 MHz. Cette différence n'est pas significative, même si la répétition de ces expériences serait nécessaire pour l'affirmer définitivement.

Par contre, l'amplitude du signal est un paramètre qui a une influence très importante sur la viabilité des micro-organismes. En effet, plus l'amplitude sera grande, plus le champ sera intense, et donc potentiellement létal pour les micro-organismes. Cette hypothèse s'est vérifiée expérimentalement. En effet, pour une capture pendant 2h à une fréquence de 10 MHz, le taux de bactéries ayant survécu après la capture est de 97% lorsque la tension vaut 10 V<sub>pp</sub>, alors qu'il chute à 45% lorsque la tension vaut 20 V<sub>pp</sub>.

## 9.5 Bilan et conclusion

Pour conclure, le tableau 9.3 récapitule les différents paramètres testés, ainsi que les taux de capture et de survie déterminés expérimentalement pour *E. coli*.

Tableau 9.3 – Récapitulatior	des paramètres testés et	des résultats expérimentaux
------------------------------	--------------------------	-----------------------------

fréquence	débit	amplitude du signal	durée des expériences	taux de capture	taux de survie
1-10 MHz	15-20 μL.h <sup>-1</sup>	10-20 Vpp	2h-3h30	97 +/- 3%	8-97 %

Dans la suite de ce travail, il faudrait confirmer ces résultats en répliquant les expériences, afin de prendre en compte la variabilité des objets biologiques manipulés. De plus, les expériences pour optimiser les différents paramètres expérimentaux ont été effectués avec *E. coli* comme microorganisme cible. Il conviendrait désormais de tester ces paramètres sur les autres micro-organismes du modèle biologique pour savoir s'il est possible d'extrapoler ces taux de capture et de survie sur d'autres espèces.

Cette étude a permis d'utiliser les paramètres optimisés du microsystème de la partie précédente pour déterminer les performances du système pour la capture de micro-organismes dans un écoulement. L'utilisation d'un signal à une fréquence de 1 à 10 MHz permet une capture générique des trois micro-organismes testés par DEP+, tout en soumettant les cellules sanguines perméabilisées à des forces de DEP-.

Tout l'enjeu de cette partie a été de déterminer un bon compromis entre viabilité et taux de capture des micro-organismes. Un taux de capture de 97% et un taux de survie de 97% ont été déterminés pour

## Chapitre 9. Résultats expérimentaux de capture en flux de micro-organismes avec le micro-système optimisé

les expériences avec *E. coli*, sous un débit de 15 à 20  $\mu$ L.h<sup>-1</sup>, avec un signal électrique de fréquence 1 MHz et d'amplitude 10 V<sub>pp</sub> pendant 2 heures. Ces résultats prometteurs devront cependant être étendus aux autres micro-organismes du modèle biologiques par des expériences complémentaires.

Nous présenterons dans la dernière partie quelques pistes pour améliorer le débit dans le microsystème afin que cette méthode de concentration puisse avoir un réel impact sur les décisions du personnel médical.

## **Conclusions et perspectives**

# Partie V

Cette dernière partie permet de faire un point quant aux objectifs initiaux de ces travaux. Dans le chapitre 10, les performances du système développé sont résumées. Les pistes d'amélioration envisagées afin d'atteindre l'objectif général de cette étude sont développées dans le chapitre 11.

# **10** Conclusion

Pour le diagnostic des infections du sang, la méthode de référence repose sur la mise en culture de l'échantillon pour augmenter la charge bactérienne et ainsi permettre la détection et l'identification du pathogène. Ces données sont essentielles pour la mise en place d'un traitement adapté pour le patient. Pour l'instant, les résultats des tests ne sont en général connus qu'après 48 à 72h, ce qui diminue fortement l'intérêt médical du diagnostic. Cela est particulièrement vrai dans le cas des septicémies car l'état d'un patient peut se dégrader très rapidement (en quelques heures). L'extraction du pathogène directement à partir de l'échantillon biologique sans l'étape chronophage de culture du micro-organisme s'avère donc essentielle pour raccourcir le délai de réponse des tests.

Comparée aux différentes méthodes de tri cellulaire commercialisées ou décrites dans la littérature scientifique, la microfluidique apporte des solutions efficaces pour l'extraction d'une souspopulation en très faible concentration dans un échantillon complexe. Dans ce travail de thèse, un protocole de préparation d'échantillon en deux étapes a été développé. Il repose sur l'utilisation de forces acoustiques et électriques dans un canal microfluidique pour permettre une capture générique de différentes espèces de micro-organismes à partir d'un échantillon sanguin.

La première étape de ce protocole consiste à transférer les cellules de l'échantillon dans un milieu adapté qui permet d'accentuer la différence entre les propriétés diélectriques des micro-organismes et celles des cellules sanguines. Des mesures d'électro-rotation ont permis de quantifier l'effet de la faible osmolarité du milieu sur les propriétés diélectriques des globules rouges afin de modéliser précisément le comportement diélectrophorétique des cellules sanguines perméabilisées.

La centrifugation est la méthode de référence pour changer des cellules de milieu. Cette méthode est cependant peu adaptée à l'extraction d'une population cellulaire en très faible concentration. Une première approche a donc consisté à effectuer une simple dilution de l'échantillon sanguin contenant les micro-organismes avec de l'eau déionisée, afin de diminuer la conductivité et l'osmolarité du

#### **Chapitre 10. Conclusion**

milieu. Ceci présente cependant l'inconvénient double d'augmenter le volume de l'échantillon à analyser et de diminuer la concentration des micro-organismes. Nous avons donc étudié la possibilité d'effectuer cette étape sans dilution en utilisant les forces acoustiques. Cette étude a permis de développer de nouvelles compétences dans le laboratoire CEA/LBAM et a abouti à la fabrication d'un microsystème et d'un banc expérimental dédié. Les premières expériences sur échantillon biologique sont prometteuses. En particulier, elles ont démontré la possibilité de manipuler par force acoustique du sang non dilué et des micro-organismes dont la taille s'approche du micron. Néanmoins les travaux n'ont pas encore permis de déterminer quantitativement les performances de ce système.

La deuxième étape repose sur l'utilisation d'un champ électrique non-uniforme pour concentrer et capturer les micro-organismes dans un écoulement microfluidique. Le recours à un milieu hypotonique et faiblement conducteur permet de perméabiliser sélectivement les cellules sanguines et de les séparer des micro-organismes en fonction du signe de la force de DEP. Les micro-organismes sont alors concentrés dans les zones de capture de DEP+ alors que les cellules sanguines perméabilisées, soumises à une faible force de DEP-, sont entraînées par l'écoulement vers la sortie du microsystème. Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication [Bisceglia et al., 2013].

Les forces de DEP dans la zone de capture ont été optimisées en étudiant la répartition du champ électrique dans la zone de capture par modélisation numérique. La pertinence de ces modèles a été testée avec succès par la comparaison des résultats de simulation et de résultats expérimentaux obtenus sur une première génération de microsystèmes. Ces modèles nous ont permis de tester l'influence de plusieurs paramètres de conception du microsystème, tels que l'épaisseur de la couche de passivation sur les électrodes, la hauteur de veine fluidique et la structure du réseau d'électrodes interdigitées, pour permettre de dégager les paramètres optimaux pour la capture de micro-organismes en flux. Ainsi un microsystème de 30µm de haut, avec un réseau d'électrodes espacées de 10µm et larges de 100µm et une couche de passivation de 150µm a été fabriqué pour évaluer les performances en flux de la diélectrophorèse pour la capture de micro-organismes dans un échantillon complexe.

Une capture de 97% des bactéries *E. coli* dans un échantillon de sang a pu être ainsi démontrée. L'élution est possible et se fait simplement en coupant le champ électrique et en utilisant la force d'entrainement du fluide. De plus, la capture générique de différentes espèces de micro-organismes (une bactérie Gram+, une bactérie Gram- et une levure) a été démontrée. L'influence de l'exposition au champ électrique sur la viabilité des micro-organismes a aussi été évaluée, et cette étude a restreint les conditions d'utilisation de ce système à une capture d'une durée de 2h avec un signal de  $10V_{pp}$ . Ces paramètres expérimentaux correspondent à un compromis entre une grande efficacité de capture et la prise en compte de l'effet létal du champ électrique sur les micro-organismes (ce travail est en cours de publication).

La vitesse moyenne de l'écoulement est de 100 à  $200\mu m.s^{-1}$ , ce qui correspond à un débit de 10 à 20  $\mu$ L.h<sup>-1</sup> dans un canal de 1mm de large. Cette valeur est basse au regard des volumes qui devraient être explorés (quelques mL) et du temps disponible pour le faire (<2h). Afin de répondre de manière plus pertinente en termes de débit au besoin d'accélération des tests de diagnostic *in vitro* pour les infections du sang, des perspectives de ce travail seront discutées dans le dernier chapitre.

# **11** Perspectives

## 11.1 Etudes complémentaires

Dans ce manuscrit, nous avons décrit la stratégie ambitieuse de coupler en série deux phénomènes physiques différents pour la concentration et la séparation de micro-organismes dans le sang. Sur chacun de ces modules, nous avons éclairé la compréhension des phénomènes en jeu et justifié nos choix de conception par une approche croisée entre modélisation et expérimentation. Enfin, nous avons montré la faisabilité technique de ces approches et estimé expérimentalement leurs performances. Certains points mériteraient cependant d'être approfondis, afin de caractériser complètement tous les aspects de la méthode.

La viabilité est un critère important pour la méthode de tri, car les méthodes de référence d'identification et de sensibilité aux antibiotiques reposent sur la mise en culture du micro-organisme. Si ce critère a joué un grand rôle dans l'optimisation des paramètres du module de DEP, il n'a pas été étudié dans le système d'acoustophorèse. En particulier, l'échauffement du transducteur piézoélectrique pendant le tri peut conduire à une élévation de la température du milieu circulant dans le canal microfluidique. Si cet échauffement est trop important, il peut avoir un effet létal sur les micro-organismes. Il convient donc d'étudier ce paramètre avec attention, en couplant notamment le transducteur piézoélectrique à un système de régulation thermique, comme un module Peltier.

En outre, les performances du système n'ont pour l'instant été validées que sur *E. coli*. Elles devront être confirmées pour les autres micro-organismes, en s'intéressant principalement au problème d'adsorption non spécifique pour garantir une élution efficace.

## 11.2 Propositions pour améliorer le débit

Les résultats expérimentaux de cette étude ont permis de montrer que la manipulation des cellules biologiques par forces acoustiques peut se faire avec des débits élevés, de l'ordre de plusieurs mL.h<sup>-1</sup>. Ces débits correspondent aux débits visés pour une application médicale de la méthode développée dans cette thèse. Néanmoins la méthode de diélectrophorèse ne permet pas une capture efficace

des micro-organismes lorsqu'ils se déplacent à une vitesse moyenne supérieure à 200  $\mu$ m.s<sup>-1</sup> dans la zone de capture. C'est cette vitesse-là qui sera limitante pour le débit global de la méthode. Les futures améliorations du microsystème devront donc s'appliquer principalement à augmenter le débit du module de tri par DEP.

### 11.2.1 Largeur du canal et des électrodes

La zone de capture dans le microsystème actuel occupe une surface d'environ  $1 \text{mm}^2$ . Sans modifier la structure globale du microsystème, il est possible d'augmenter la largeur du canal microfluidique afin d'augmenter le débit, sans augmenter la vitesse de déplacement des cellules. Il serait alors envisageable d'atteindre un débit de 100 à 200  $\mu$ L.h<sup>-1</sup> avec une surface de  $1 \text{cm}^2$ , si l'on augmente d'un facteur 10 la largeur du canal. En outre, puisque nous avons montré que la largeur des électrodes n'avait pas une influence importante sur l'intensité de la force de DEP, il est possible de réduire cette taille. Cela ne permettra pas d'augmenter le débit, mais de réduire la surface de capture.

#### 11.2.2 Hauteur du canal

Pendant le dimensionnement du microsystème, une contrainte a été imposée sur la hauteur du canal, qui ne doit pas dépasser 30µm au-dessus du réseau d'électrodes pour permettre une capture efficace. Il est possible d'imaginer la fabrication d'un nouveau microsystème avec deux réseaux d'électrodes, un au fond du canal et un autre directement sur le capot en haut du canal. Cet agencement permettrait d'augmenter d'un facteur 2 la hauteur du canal, donc d'autant le débit. Une équipe du MIT a aussi imaginé une structuration du capot avec des chevrons pour permettre un meilleur brassage de l'échantillon au-dessus des électrodes et ainsi augmenter la capacité de capture des microorganismes [Gadish and Voldman, 2006].

#### 11.2.3 Parallélisation

Toutefois les améliorations citées ci-dessus ne suffiront pas pour atteindre un débit compatible avec notre objectif. En effet, comme décrit dans la partie I, l'objectif idéal serait de pouvoir extraire les pathogènes d'un échantillon sanguin d'un volume de l'ordre de 10mL, et ceci durant un temps acceptable, soit quelques heures. Il faut donc atteindre des débits de l'ordre du mL.h<sup>-1</sup>. Pour obtenir un tel débit, il sera nécessaire de paralléliser les microsystèmes de DEP. Il est alors envisageable d'augmenter le débit par un facteur 10 ou plus.

## 11.3 Nouvelle architecture : vers l'intégration dans un consommable microfluidique

Les modules d'échange de milieu et de capture par DEP peuvent être associés en série dans un unique système microfluidique. Le dimensionnement du module d'échange de milieu par acoustophorèse permet déjà d'atteindre un débit suffisamment important (de l'ordre de 5mL.h<sup>-1</sup>). En revanche, il

convient d'associer en parallèle plusieurs modules de DEP pour atteindre un débit acceptable. En élargissant le canal de chaque module par un facteur 10, et en associant 8 modules en parallèle, on peut atteindre un débit de 1.2mL.h<sup>-1</sup>.



FIGURE 11.1 – Nouvelle architecture qui permet d'associer les différents modules développés dans ce manuscrit pour atteindre un débit suffisamment important pour une application médicale.

Un montage hybride de composants silicium intégrés à une carte plastique est une option pertinente pour cette association, afin de limiter l'utilisation du silicium aux seules zones où ce matériau est nécessaire. Dans l'architecture présentée figure 11.1, l'échantillon sanguin est injecté dans les entrées latérales du premier module. Les forces acoustiques transfèrent les micro-organismes et les cellules sanguines au centre du canal, où circule de l'eau déionisée. A la sortie de ce module, le milieu de suspension des cellules a donc été modifié, et les cellules sanguines sont perméabilisées. Les micro-organismes sont ensuite capturés dans les modules de DEP à la surface des électrodes par DEP+ alors que les cellules sanguines sont évacuées par l'écoulement vers la sortie principale. En coupant le champ électrique, les micro-organismes capturés peuvent ensuite être élués dans un petit volume pour poursuivre l'analyse. Cette architecture permet donc la capture et à la concentration par un facteur 10<sup>3</sup> de pathogènes à partir d'un échantillon sanguin non dilué.

Pour conclure, nous avons la conviction que l'utilisation de ce nouveau système microfluidique pour extraire les micro-organismes d'un échantillon de sang permettra d'accélérer le diagnostic *in vitro* des septicémies et de délivrer une information à forte valeur médicale dans un temps réduit, en apportant une solution pour la décomplexification rapide de l'échantillon, qui est une étape cruciale

pour les nouvelles méthodes d'identification.

## **Bibliographie**

- Adams, J. D., Ebbesen, C. L., Barnkob, R., Yang, A. H. J., Soh, H. T., and Bruus, H. (2012). Highthroughput, temperature-controlled microchannel acoustophoresis device made with rapid prototyping. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 22(7).
- Afshari, A., Schrenzel, J., Ieven, M., and Harbarth, S. (2012). Bench-to-bedside review : Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection a new frontier? *Critical Care*, 16(3).
- Alazzam, A., Roman, D., Nerguizian, V., Stiharu, I., and Bhat, R. (2010). Analytical formulation of electric field and dielectrophoretic force for moving dielectrophoresis using fourier series. *Microfluidics and Nanofluidics*, 9(6) :1115–1124.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1998). *Biologie moléculaire de la cellule*.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M. R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the united states : Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29(7) :1303–1310.
- Aran, K., Morales, M., Sasso, L. A., Lo, J., Zheng, M., Johnston, I., Kamdar, N., Ündar, A., and Zahn, J. D. (2011). Microfiltration device for continuous, label-free bacteria separation from whole blood for sepsis treatment. In 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Seattle, Washington, USA.
- Arnold, W. M. and Zimmermann, U. (1988). Electro-rotation development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *Journal of Electrostatics*, 21(2-3):151– 191.
- Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letters*, 24(4):156–159.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., and Chu, S. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5) :288–290.
- Autebert, J., Coudert, B., Bidard, F. C., Pierga, J. Y., Descroix, S., Malaquin, L., and Viovy, J. L. (2012). Microfluidic : An innovative tool for efficient cell sorting. *Methods*, 57(3) :297–307.
- Banada, P. P., Chakravorty, S., Shah, D., Burday, M., Mazzella, F. M., and Alland, D. (2012). Highly sensitive detection of staphylococcus aureus directly from patient blood. *Plos One*, 7(2).
- Bartholomew, J. W. and Mittwer, T. (1952). The gram stain. Bacteriological Reviews, 16(1):1-29.

- Becker, F. F., Wang, X. B., Huang, Y., Pethig, R., Vykoukal, J., and Gascoyne, P. R. C. (1995). Separation of human breast-cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3) :860–864.
- Beekmann, S. E., Diekema, D. J., Chapin, K. C., and Doern, G. V. (2003). Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7) :3119–3125.
- Berg, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, 4(11):430-435.
- Bhagat, A. A. S., Bow, H., Hou, H. W., Tan, S. J., Han, J., and Lim, C. T. (2010). Microfluidics for cell separation. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 48(10) :999–1014.
- Bianchi, D. W., Flint, A. F., Pizzimenti, M. F., Knoll, J. H., and Latt, S. A. (1990). Isolation of fetal dna from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9):3279–3283.
- Bisceglia, E., Cubizolles, M., Mallard, F., Vinet, F., Français, O., and Le Pioufle, B. (2013). Microorganism extraction from biological samples using dep forces enhanced by osmotic shock. *Lab on a Chip*, 13(5) :901–909.
- Blaser, M. J., Perezperez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N., and Nomura, A. (1995). Infection with helicobacter-pylori strains possessing caga is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*, 55(10) :2111–2115.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. H., and Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6) :1644–1655.
- Bonner, W. A., Sweet, R. G., Hulett, H. R., and Herzenbe.La (1972). Fluorescence activated cell sorting. *Review of Scientific Instruments*, 43(3) :404–409.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C., and Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55(4):244–265.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Bradley, J., Guidos, R. J., Jones, R. N., Murray, B. E., Bonomo, R. A., and Gilbert, D. (2013). 10 x '20 progress-development of new drugs active against gram-negative bacilli : An update from the infectious diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases*, 56(12) :1685–1694.
- Braschler, T., Demierre, N., Nascimento, E., Silva, T., Oliva, A. G., and Renaud, P. (2008). Continuous separation of cells by balanced dielectrophoretic forces at multiple frequencies. *Lab on a Chip*, 8(2) :280–286.
- Cabanel, N., Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Annajar, B., Rajerison, M., Bekkhoucha, S., Bertherat, E., and Carniel, E. (2013). Plague outbreak in libya, 2009, unrelated to plague in algeria. *Emerging Infectious Diseases*, 19(2) :230–236.
- Casier, P. (2004). Panorama des automates de laboratoires. ITBM-RBM News, 25(2):11-35.
- Castellanos, A., Ramos, A., Gonzalez, A., Green, N. G., and Morgan, H. (2003). Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems : scaling laws. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36(20) :2584–2597.

- Castellarnau, M., Errachid, A., Madrid, C., Juarez, A., and Samitier, J. (2006). Dielectrophoresis as a tool to characterize and differentiate isogenic mutants of escherichia coli. *Biophysical Journal*, 91(10) :3937–3945.
- Chin, C. D., Linder, V., and Sia, S. K. (2012). Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 12(12) :2118–2134.
- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., and Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 14(11):1584–1586.
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. Nature, 420(6917):885-891.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of escherichia-coli by r-factor dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8) :2110–2114.
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W. M. M., and Hayes, D. F. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(8):781–791.
- Croize, J., Recule, C., Pelloux, I., Chanteperdrix, V., and Maurin, M. (2007). L'automatisation en bactériologie : un challenge continu. l'expérience du centre hospitalier universitaire de grenoble. *Spectra biologie*, 26(160) :45–51.
- Crosland-Taylor, P. J. (1953). A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*, 171(4340) :37–38.
- Cummings, E. B. and Singh, A. K. (2003). Dielectrophoresis in microchips containing arrays of insulating posts : Theoretical and experimental results. *Analytical Chemistry*, 75(18):4724–4731.
- Davis, J. A., Inglis, D. W., Morton, K. J., Lawrence, D. A., Huang, L. R., Chou, S. Y., Sturm, J. C., and Austin, R. H. (2006). Deterministic hydrodynamics : Taking blood apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40) :14779–14784.
- de Sande-Bruinsma, N. V., Grundmann, H., Verloo, D., Tiemersma, E., Monen, J., Goossens, H., and Ferech, M. (2008). Antimicrobial drug use and resistance in europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14(11) :1722–1730.
- Dellinger, R. P., Levy, M. M., Carlet, J. M., Bion, J., Parker, M. M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D. C., Brun-Buisson, C., Beale, R., Calandra, T., Dhainaut, J. F., Gerlach, H., Harvey, M., Marini, J. J., Marshall, J., Ranieri, M., Ramsay, G., Sevransky, J., Thompson, B. T., Townsend, S., Vender, J. S., Zimmerman, J. L., and Vincent, J. L. (2008). Surviving sepsis campaign : International guidelines for management of severe sepsis and septic shock : 2008. *Critical Care Medicine*, 36(1) :296–327.
- Demircan, Y., Ozgur, E., and Kulah, H. (2013). Dielectrophoresis : Applications and future outlook in point of care. *Electrophoresis*, 34(7) :1008–1027.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., and Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164) :811–818.
- DiBaise, J. K., Zhang, H., Crowell, M. D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G. A., and Rittmann, B. E. (2008). Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(4):460–469.

- Donato, S. S., Chu, V., Prazeres, D. M. F., and Conde, J. P. (2013). Metabolic viability of escherichia coli trapped by dielectrophoresis in microfluidics. *Electrophoresis*, 34(4):575–582.
- ECDPC (2009). The bacterial challenge : time to react technical report. *European Centre for Disease Prevention and Control.*
- Edwards-Jones, V., Claydon, M. A., Evason, D. J., Walker, J., Fox, A. J., and Gordon, D. B. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3) :295–300.
- Egger, M., Donath, E., Spangenberg, P., Bimmler, M., Glaser, R., and Till, U. (1988). Human-platelet electrorotation change induced by activation inducer specificity and correlation to serotonin release. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 972(3) :265–276.
- Einstein, A. (1905). On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annalen der Physik*, 17(549-560) :16.
- Fischbach, F. and Dunning III, M. B. (2009). A manual of Laboratory and Diagnostic Tests.
- Fox, M. B., Esveld, D. C., Valero, A., Luttge, R., Mastwijk, H. C., Bartels, P. V., van den Berg, A., and Boom, R. M. (2006). Electroporation of cells in microfluidic devices : a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(3):474–485.
- Frénéa-Robin, M., Burais, N., Buret, F., Haddour, N., Nicolas, L., Perrussel, R., Scorretti, R., Siauve, N., and Voyer, D. (2009). Electromagnetic characterization of biological cells. In *International Conference on Electromagnetic Fields, Health and Environment*, Sao Paulo.
- Furlani, E. P. (2007). Magnetophoretic separation of blood cells at the microscale. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 40(5):1313–1319.
- Gadish, N. and Voldman, J. (2006). High-throughput positive-dielectrophoretic bioparticle microconcentrator. *Analytical Chemistry*, 78(22) :7870–7876.
- Gascoyne, P., Pethig, R., Satayavivad, J., Becker, F. F., and Ruchirawat, M. (1997). Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1323(2):240–252.
- Gehl, J. (2003). Electroporation : theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177(4) :437–447.
- Geveke, D. J. and Kozempel, M. F. (2003). Pulsed electric field effects on bacteria and yeast cells. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(1):65–72.
- Giddings, J. C. (1993). Field-flow fractionation analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science*, 260(5113) :1456–1465.
- Gimsa, J. (2001). A comprehensive approach to electro-orientation, electrodeformation, dielectro-phoresis, and electrorotation of ellipsoidal particles and biological cells. *Bioelectrochemistry*, 54(1):23–31.
- Gossett, D. R., Weaver, W. M., Mach, A. J., Hur, S. C., Tse, H. T. K., Lee, W., Amini, H., and Di Carlo, D. (2010). Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8) :3249–3267.

- Goto, M. and Al-Hasan, M. N. (2013). Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in north america and europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6) :501– 509.
- Hall, M. J., Williams, S. N., DeFrances, C. J., and Golosinskiy, A. (2011). Inpatient care for septicemia or sepsis : A challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*, 62(62).
- Hammarstrom, B., Laurell, T., and Nilsson, J. (2012). Seed particle-enabled acoustic trapping of bacteria and nanoparticles in continuous flow systems. *Lab on a Chip*, 12(21):4296–4304.
- Han, K. H. and Frazier, A. B. (2008). Lateral-driven continuous dielectrophoretic microseparators for blood cells suspended in a highly conductive medium. *Lab on a Chip*, 8(7) :1079–1086.
- Handschur, M., Karlic, H., Hertel, C., Pfeilstocker, M., and Haslberger, A. G. (2009). Preanalytic removal of human dna eliminates false signals in general 16s rdna pcr monitoring of bacterial pathogens in blood. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 32(3) :207–219.
- Harbarth, S., Garbino, J., Pugin, J., Romand, J. A., Lew, D., and Pittet, D. (2003). Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *American Journal of Medicine*, 115(7):529–535.
- HCUP (2009). Statistics on hospital-based care in the united states. *Healthcare Cost and Utilization Project.*
- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., and Knorr, D. (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology*, 12(3-4):103–111.
- Henry, N. K., McLimans, C. A., Wright, A. J., Thompson, R. L., Wilson, W. R., and Washington, J. A. (1983). Microbiological and clinical-evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(5) :864–869.
- Hölzel, R. (1997). Electrorotation of single yeast cells at frequencies between 100 hz and 1.6 ghz. *Biophysical Journal*, 73(2) :1103–1109.
- Hölzel, R. (1999). Non-invasive determination of bacterial single cell properties by electrorotation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1450(1):53–60.
- Holzapfel, C., Vienken, J., and Zimmermann, U. (1982). Rotation of cells in an alternating electric-field theory and experimental proof. *Journal of Membrane Biology*, 67(1):13–26.
- Hou, H. W., Gan, H. Y., Bhagat, A. A. S., Li, L. D., Lim, C. T., and Han, J. (2012). A microfluidics approach towards high-throughput pathogen removal from blood using margination. *Biomicrofluidics*, 6(2).
- Hou, H. W., Warkiani, M. E., Khoo, B. L., Li, Z. R., Soo, R. A., Tan, D. S. W., Lim, W. T., Han, J., Bhagat, A. A. S., and Lim, C. T. (2013). Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Scientific Reports*, 3(1259).
- Hoyert, D. L. and Xu, J. (2012). Deaths : Preliminary data for 2011. *National Vital Statistics Reports*, 61(6).
- Huang, W. E., Griffiths, R. I., Thompson, I. P., Bailey, M. J., and Whiteley, A. S. (2004). Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Analytical Chemistry*, 76(15):4452–4458.

- Huang, Y., Holzel, R., Pethig, R., and Wang, X. B. (1992). Differences in the ac electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies. *Physics in Medicine and Biology*, 37(7) :1499–1517.
- Huang, Y. and Pethig, R. (1991). Electrode design for negative dielectrophoresis. *Measurement Science* & *Technology*, 2(12) :1142–1146.
- Huebner, R. J. and Todaro, G. J. (1969). Oncogenes of rna tumor viruses as determinants of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(3) :1087–1094.
- Hughes, M. P. (2000). Ac electrokinetics : applications for nanotechnology. *Nanotechnology*, 11(2) :124–132.
- Hwang, K. Y., Lim, H. K., Jung, S. Y., Namkoong, K., Kim, J. H., Huh, N., Ko, C., and Park, J. C. (2008). Bacterial dna sample preparation from whole blood using surface-modified si pillar arrays. *Analytical Chemistry*, 80(20) :7786–7791.
- IDSA (2004). Bad bugs, no drugs : as antibiotic discovery stagnates, a public health crisis brews. *Infectious Diseases Society of America.*
- Inglis, D. W., Riehn, R., Austin, R. H., and Sturm, J. C. (2004). Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation. *Applied Physics Letters*, 85(21) :5093–5095.
- Ji, H. M., Samper, V., Chen, Y., Heng, C. K., Lim, T. M., and Yobas, L. (2008). Silicon-based microfilters for whole blood cell separation. *Biomedical Microdevices*, 10(2):251–257.
- Jonas, A. and Zemanek, P. (2008). Light at work : The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis. *Electrophoresis*, 29(24) :4813–4851.
- Jung, J. and Han, K. H. (2008). Lateral-driven continuous magnetophoretic separation of blood cells. *Applied Physics Letters*, 93(22).
- Kastanos, E. K., Kyriakides, A., Hadjigeorgiou, K., and Pitris, C. (2006). A novel method for urinary tract infection diagnosis and antibiogram using raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(9):958–963.
- Kayani, A. A., Khoshmanesh, K., Ward, S. A., Mitchell, A., and Kalantar-Zadeh, K. (2012). Optofluidics incorporating actively controlled micro- and nano-particles. *Biomicrofluidics*, 6(3).
- Khoshmanesh, K., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A., and Kalantar-zadeh, K. (2010). Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5):1800–1814.
- Khoshmanesh, K., Zhang, C., Tovar-Lopez, F. J., Nahavandi, S., Baratchi, S., Kalantar-Zadeh, K., and Mitchell, A. (2009). Dielectrophoretic manipulation and separation of microparticles using curved microelectrodes. *Electrophoresis*, 30(21) :3707–3717.
- Kriegmaier, M., Zimmermann, M., Wolf, K., Zimmermann, U., and Sukhorukov, V. L. (2001). Dielectric spectroscopy of schizosaccharomyces pombe using electrorotation and electroorientation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1568(2) :135–146.
- Krulova, B., Nemcova, E., Zaloudikova, B., Nemec, P., and Freiberger, T. (2009). Comparison of commercial dna extraction kits for the detection of bacterial genomic dna from whole-blood samples using a broad-range pcr. *Critical Care C7 P13*, 13(Suppl 4):1–1.

- Kuczenski, R. S., Chang, H.-C., and Revzin, A. (2011). Dielectrophoretic microfluidic device for the continuous sorting of escherichia coli from blood cells. *Biomicrofluidics*, 5:032005.
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., and Cheang, M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*, 34(6) :1589–1596.
- Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. A. S., Kumar, G., and Papautsky, I. (2009). Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab on a Chip*, 9(20) :2973–2980.
- La Scola, B. and Raoult, D. (2009). Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Plos One*, 4(11).
- Lamy, B. (2005). Automates pour hémoculture en 2005. BioTribune Magazine, 16(1):35-40.
- Lapizco-Encinas, B. H., Simmons, B. A., Cummings, E. B., and Fintschenko, Y. (2004). Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators. *Analytical Chemistry*, 76(6) :1571–1579.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Abu Al-Soud, W., Sorensen, S. J., Hansen, L. H., and Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *Plos One*, 5(2).
- Laurell, T., Petersson, F., and Nilsson, A. (2007). Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. *Chemical Society Reviews*, 36(3):492–506.
- Leibovici, L., Shraga, I., Drucker, M., Konigsberger, H., Samra, Z., and Pitlik, S. D. (1998). The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *Journal of Internal Medicine*, 244(5):379–386.
- Lenshof, A. and Laurell, T. (2009). Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, 39(3) :1203–1217.
- Lenshof, A., Magnusson, C., and Laurell, T. (2012). Acoustofluidics 8 : Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems. *Lab on a Chip*, 12(7) :1210–1223.
- Li, H. and Bashir, R. (2002). Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of listeria on microfabricated devices with interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 86(2-3) :215–221.
- Lowe, G. D. O., Drummond, M. M., Lorimer, A. R., Hutton, I., Forbes, C. D., Prentice, C. R. M., and Barbenel, J. C. (1980). Relation between extent of coronary-artery disease and blood-viscosity. *British Medical Journal*, 280(6215) :673–674.
- MacDonald, M. P., Spalding, G. C., and Dholakia, K. (2003). Microfluidic sorting in an optical lattice. *Nature*, 426(6965) :421–424.
- MacQueen, L. A., Buschmann, M. D., and Wertheimer, M. R. (2008). Gene delivery by electroporation after dielectrophoretic positioning of cells in a non-uniform electric field. *Bioelectrochemistry*, 72(2):141–148.
- Madou, M., Zoval, J., Jia, G., Kido, H., Kim, J., and Kim, N. (2006). Lab on a cd. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1):601–628.

- Manz, A., Graber, N., and Widmer, H. M. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1(1-6) :244–248.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D., and Puppels, G. J. (2003). Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1):324–329.
- Mariella, R. (2008). Sample preparation : the weak link in microfluidics-based biodetection. *Biomedical Microdevices*, 10(6) :777–784.
- Markx, G. H., Huang, Y., Zhou, X. F., and Pethig, R. (1994). Dielectrophoretic characterization and separation of microorganisms. *Microbiology-Uk*, 140:585–591.
- Marszalek, P., Liu, D. S., and Tsong, T. Y. (1990). Schwan equation and transmembrane potential induced by alternating electric-field. *Biophysical Journal*, 58(4) :1053–1058.
- Martin, C. L. (2010). i-stat combining chemistry and haematology in poct. *The Clinical Biochemist Reviews*, 31(3):81–84.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348(16):1546–1554.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., and Whitesides, G. M. (2008). Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50) :19606–19611.
- Masur, H., Ognibene, F. P., Yarchoan, R., Shelhamer, J. H., Baird, B. F., Travis, W., Suffredini, A. F., Deyton, L., Kovacs, J. A., Falloon, J., Davey, R., Polis, M., Metcalf, J., Baseler, M., Wesley, R., Gill, V. J., Fauci, A. S., and Lane, H. C. (1989). Cd4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (hiv) infection. *Annals of Internal Medicine*, 111(3):223–231.
- Miller, M. C., Doyle, G. V., and Terstappen, L. W. M. M. (2009). Significance of circulating tumor cells detected by the cellsearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *Journal of Oncology*, 2010(2010).
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High-gradient magnetic cell-separation with macs. *Cytometry*, 11(2):231–238.
- Mitchell, J. G. and Kogure, K. (2005). Bacterial motility : links to the environment and a driving force for microbial physics. *Fems Microbiology Ecology*, 55(1) :3–16.
- Moncada-Hernandez, H. and Lapizco-Encinas, B. (2010). Simultaneous concentration and separation of microorganisms : insulator-based dielectrophoretic approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(5) :1805–1816.
- Morgan, H., Izquierdo, A. G., Bakewell, D., Green, N. G., and Ramos, A. (2001). The dielectrophoretic and travelling wave forces generated by interdigitated electrode arrays : analytical solution using fourier series. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 34(10) :1553–1561.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of dna invitro the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 :263–273.

- Murthy, S. K., Sin, A., Tompkins, R. G., and Toner, M. (2004). Effect of flow and surface conditions on human lymphocyte isolation using microfluidic chambers. *Langmuir*, 20(26) :11649–11655.
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., and Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173) :1235–1239.
- Nerguizian, V., Alazzam, A., Roman, D., Stiharu, I., and Burnier, M. (2012). Analytical solutions and validation of electric field and dielectrophoretic force in a bio-microfluidic channel. *Electrophoresis*, 33(3):426–435.
- Neumann, E., Schaeferridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene-transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric-fields. *Embo Journal*, 1(7):841–845.
- Nilsson, A., Petersson, F., Jonsson, H., and Laurell, T. (2004). Acoustic control of suspended particles in micro fluidic chips. *Lab on a Chip*, 4(2) :131–135.
- Noble, P. and Cutts, J. (1967). Separation of blood leukocytes by ficoll gradient. *The Canadian Veterinary Journal*, 8(5) :110–111.
- Oh, J., Hart, R., Capurro, J., and Noh, H. (2009). Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform ac electric fields in a microchannel. *Lab on a Chip*, 9(1):62–78.
- Pamme, N. (2007). Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 7(12):1644–1659.
- Pamme, N. and Wilhelm, C. (2006). Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. *Lab on a Chip*, 6.
- Petersson, F., Aberg, L., Sward-Nilsson, A. M., and Laurell, T. (2007). Free flow acoustophoresis : Microfluidic-based mode of particle and cell separation. *Analytical Chemistry*, 79(14) :5117–5123.
- Petersson, F., Nilsson, A., Holm, C., Jonsson, H., and Laurell, T. (2004). Separation of lipids from blood utilizing ultrasonic standing waves in microfluidic channels. *Analyst*, 129(10) :938–943.
- Petersson, F., Nilsson, A., Jonsson, H., and Laurell, T. (2005). Carrier medium exchange through ultrasonic particle switching in microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, 77(5):1216–1221.
- Pethig, R. (2010). Review article-dielectrophoresis : Status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics*, 4(2).
- Pethig, R., Huang, Y., Wang, X. B., and Burt, J. P. H. (1992). Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 25(5):881–888.
- Pethig, R. and Kell, D. B. (1987). The passive electrical-properties of biological-systems their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine and Biology*, 32(8):933–970.
- Pethig, R. and Markx, G. H. (1997). Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 15(10) :426–432.

- Piacentini, N., Mernier, G., Tornay, R., and Renaud, P. (2011). Separation of platelets from other blood cells in continuous-flow by dielectrophoresis field-flow-fractionation. *Biomicrofluidics*, 5(3).
- Podnecky, N. L., Elrod, M. G., Newton, B. R., Dauphin, L. A., Shi, J., Chawalchitiporn, S., Baggett, H. C., Hoffmaster, A. R., and Gee, J. E. (2013). Comparison of dna extraction kits for detection of burkholderia pseudomallei in spiked human whole blood using real-time pcr. *Plos One*, 8(2).
- Pray, L. A. (2008). Antibiotic r& d : resolving the paradox between unmet medical need and commercial incentive. Technical report, Cambridge Healthtech Institute, (Insight Pharma Reports).
- Puc, M., Corovic, S., Flisar, K., Petkovsek, M., Nastran, J., and Miklavcic, D. (2004). Techniques of signal generation required for electropermeabilization : Survey of electropermeabilization devices. *Bioelectrochemistry*, 64(2) :113–124.
- Purcell, E. M. (1977). Life at low reynolds-number. American Journal of Physics, 45(1):3-11.
- Radisic, M., Iyer, R. K., and Murthy, S. K. (2006). Micro- and nanotechnology in cell separation. *International Journal of Nanomedicine*, 1(1):3–14.
- Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., and Castellanos, A. (1998). Ac electrokinetics : a review of forces in microelectrode structures. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 31(18) :2338–2353.
- Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Michelini, E., and Roda, A. (2005). Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23(9):475–483.
- Reverberi, R. and Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*, 5(4) :227–240.
- Sale, A. J. H. and Hamilton, W. A. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms .i. killing of bacteria and yeasts. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 148(3) :781–788.
- Schulte, T. H., Bardell, R. L., and Weigl, B. H. (2002). Microfluidic technologies in clinical diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, 321(1-2) :1–10.
- Shi, J. J., Mao, X. L., Ahmed, D., Colletti, A., and Huang, T. J. (2008). Focusing microparticles in a microfluidic channel with standing surface acoustic waves (ssaw). *Lab on a Chip*, 8(2):221–223.
- Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., and Edwards, J. E. (2004). Trends in antimicrobial drug development : Implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9) :1279–1286.
- Squires, T. M. and Quake, S. R. (2005). Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77(3) :977–1026.
- Suehiro, J., Hamada, R., Noutomi, D., Shutou, M., and Hara, M. (2003). Selective detection of viable bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method. *Journal of Electrostatics*, 57(2):157–168.
- Sukhorukov, V. L., Mussauer, H., and Zimmermann, U. (1998). The effect of electrical deformation forces on the electropermeabilization of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. *Journal of Membrane Biology*, 163(3) :235–245.
- Takagi, J., Yamada, M., Yasuda, M., and Seki, M. (2005). Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches. *Lab on a Chip*, 5(7) :778–784.
- Teissie, J. and Rols, M. P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell-membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65(1):409–413.

190

- Toru, S., Frénéa-Robin, M., Haddour, N., and Buret, F. (2012). Tunable and label-free bacteria alignment using standing surface acoustic waves. In *Engineering in Medicine and Biology Society* (*EMBC*), 2012 Annual International Conference of the IEEE, pages 4998–5001. IEEE.
- Trainito, C. (2012). Determination of electro-physical properties of cells using rotating electric field.
- Tsutsui, H. and Ho, C. M. (2009). Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems. *Mechanics Research Communications*, 36(1):92–103.
- Tu, X., Das, K., Han, Q., Bauman, J. D., Clark, A. D., Hou, X., Frenkel, Y. V., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Sarafianos, S. G., and Arnold, E. (2010). Structural basis of hiv-1 resistance to azt by excision. *Nat Struct Mol Biol*, 17(10) :1202–1209.
- Ubukata, K., Nonoguchi, R., Matsuhashi, M., and Konno, M. (1989). Expression and inducibility in staphylococcus-aureus of the meca gene, which encodes a methicillin-resistant s aureus specific penicillin-binding protein. *Journal of Bacteriology*, 171(5) :2882–2885.
- VanDelinder, V. and Groisman, A. (2006). Separation of plasma from whole human blood in a continuous cross-flow in a molded microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 78(11):3765–3771.
- Vincent, J. L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J. R., and Payen, D. (2006). Sepsis in european intensive care units : Results of the soap study. *Critical Care Medicine*, 34(2) :344–353.
- Voldman, J. (2006). Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8:425–454.
- Wang, H. Y. and Lu, C. (2006). High-throughput and real-time study of single cell electroporation using microfluidics : Effects of medium osmolarity. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6) :1116– 1125.
- Wang, X. B., Huang, Y., Gascoyne, P. R. C., and Becker, F. F. (1997). Dielectrophoretic manipulation of particles. *Ieee Transactions on Industry Applications*, 33(3) :660–669.
- Wasilauskas, B. and Morrell, R. (1994). Inhibitory effect of the isolator blood culture system on growth of mycobacterium-avium mycobacterium-intracellulare in bactec 12b bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3):654–657.
- Weaver, W. M., Milisavljevic, V., Miller, J. F., and Di Carlo, D. (2012). Fluid flow induces biofilm formation in staphylococcus epidermidis polysaccharide intracellular adhesin-positive clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16):5890–5896.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10):3741–3751.
- Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., and Weigl, B. H. (2006). Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 442(7101) :412–418.
- Yagupsky, P., Peled, N., Press, J., Abramson, O., and AbuRashid, M. (1997). Comparison of bactec 9240 peds plus medium and isolator 1.5 microbial tube for detection of brucella melitiensis from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6) :1382–1384.

- Yamada, M., Nakashima, M., and Seki, M. (2004). Pinched flow fractionation : Continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical Chemistry*, 76(18) :5465–5471.
- Yang, J., Huang, Y., Wang, X. J., Wang, X. B., Becker, F. F., and Gascoyne, P. R. C. (1999). Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion. *Biophysical Journal*, 76(6) :3307–3314.
- Yun, H., Kim, K., and Lee, W. G. (2013). Cell manipulation in microfluidics. *Biofabrication*, 5(2).
- Yung, C. W., Fiering, J., Mueller, A. J., and Ingber, D. E. (2009). Micromagnetic-microfluidic blood cleansing device. *Lab on a Chip*, 9(9) :1171–1177.

# A Modèles biologiques

## A.1 Billes

Des billes fluorescentes de 1 et 5 µm de diamètre (Duke) ont été utilisées pour modéliser grossièrement des cellules. Ce modèle très simple a été utilisé lorsque les conditions expérimentales ne nous permettaient pas d'utiliser du matériel biologique et que le confinement de l'échantillon ne pouvait pas être garanti.

La solution commerciale est une suspension de billes de concentration de 10<sup>12</sup> billes /mL. Les billes sont ensuite diluées par 1000 dans de l'eau déionisée.

Elles sont observées au microscope à fluorescence avec un filtre qui permet d'éclairer l'échantillon avec une lumière d'excitation à 470nm et qui filtre la lumière d'émission de l'échantillon à 510nm.

## A.2 Sang humain

Il est très difficile de modéliser le comportement des cellules biologiques par des objets inertes comme des billes, entre autres à cause de leur différence de forme, de déformabilité, et de polarisabilité. La plupart des expériences de tri ont donc été faites directement avec des cellules sanguines. Les échantillons de sang sont prélevés sur des donneurs volontaires par l'Etablissement Français du Sang dans des tubes Vacutainer (BD) qui contiennent de l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) comme agent anticoagulant (figure A.1).

L'EFS fournit ensuite des tubes au CEA, après avoir effectué des tests de sérologie pour vérifier l'absence de pathologies graves chez les donneurs. Les tubes sont donc conservés à 4 °C pendant ces tests, qui prennent en général 48h. Cette conservation modifie un peu l'état des cellules par rapport à un prélèvement frais. En particulier, ces circonstances modifient le comportement des plaquettes, qui peuvent alors émettre des pseudopodes (des prolongements cytoplasmiques de forme très diverse) : les plaquettes sont dites activées.

Pour faciliter l'observation du comportement des cellules pendant les expériences, nous avons



FIGURE A.1 – Tube Vacutainer (BD) EDTA dans lequel le sang est prélevé et acheminé jusqu'au CEA.

souvent décomplexifié l'échantillon sanguin en isolant les trois grandes populations cellulaires : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

### A.2.1 Globules rouges

Pour préparer une solution concentrée de globules rouges, il suffit de centrifuger du sang complet à 600g pendant 15 minutes pour séparer les globules rouges des autres populations cellulaires (figure 3.1 A). Les globules rouges, plus denses, se retrouvent au fond du tube. Il est alors possible d'en prélever une partie avec une pipette.

### A.2.2 Globules blancs

Pour préparer une solution concentrée en globules blancs, le sang est centrifugé dans un tube Vacutainer CPT (BD) à 1500g pendant 20 min. On récupère ensuite à la pipette la couche entre le plasma et la barrière de gel (figure 3.1 B). Pour séparer les globules blancs des plaquettes contenues dans la couche récupérée, l'échantillon est ensuite centrifugé à 150g pendant 10 minutes. A cette vitesse, les plaquettes restent dans le plasma et le culot de cellules est donc un concentré de globules blancs.

### A.2.3 Plaquettes

Pour préparer un concentré de plaquettes, le sang est centrifugé à 150g pendant 10 minutes. On récupère ensuite le plasma riche en plaquettes (PRP) à l'aide d'une pipette. Le PRP est ensuite centrifugé à 1500g pendant 10 minutes pour obtenir un culot de plaquettes.

## A.3 Micro-organismes

### A.3.1 Modèle biologique

Pour valider la méthode de tri présentée dans ce manuscrit, nous avons travaillé avec un modèle biologique composé de trois micro-organismes :

- Escherichia coli ATCC 35421 (bactérie Gram-)
- Staphylococcus epidermidis ATCC 14990 (bactérie Gram+)
- Candida albicans ATCC 18804 (levure)

### A.3.2 Conservation

Les souches sont conservées à -80°C, et étalées sur des boîtes de TSA<sup>1</sup> (bioMerieux), puis placées dans un incubateur à 37°C pendant 24h pour que des colonies isolées se forment. Ces boîtes servent de réserve pour prélever des colonies, et peuvent être conservées 3 semaines à 4°C.

## A.3.3 Culture

La préparation des échantillons microbiologiques se fait toujours suivant le protocole suivant. Une colonie est prélevée d'une boîte de culture conservée à 4°C, et resuspendue dans un tube contenant 4 mL de milieu de culture. Le tube est ensuite placé dans un incubateur à 30°C pour une nuit (on appelle cette étape une pré-culture). Une dilution au 1/50ème est ensuite effectuée à partir de la pré-culture dans un nouveau milieu de culture. Ce 2ème tube est placé dans un incubateur à une température optimale pour la croissance du micro-organisme, qui dépend de l'espèce. La durée d'incubation dépend aussi de l'espèce : elle est adaptée en fonction du temps de génération du micro-organisme, pour obtenir toujours la même concentration en micro-organismes dans la solution. Le tableau A.1 récapitule les différentes conditions pour chacun des 3 micro-organismes de notre modèle biologique.

Le but de cette préparation standardisé est d'obtenir, à la fin du protocole, une solution calibrée qui contient des micro-organismes dans le même stade de développement, en phase de division.

Tableau A.1 – Conditions de culture pour chaque micro-organisme dans notre modèle biologique

espèce	milieu de culture	température de culture	temps de culture
E. coli	TSB <sup>2</sup> (bioMérieux)	37°C	2h
S. epidermidis	TSB (bioMérieux)	37°C	4h
C. albicans	Sabouraud (bioMérieux)	30°C	4h

## A.3.4 Préparation des échantillons

Lorsqu'on souhaite remplacer le milieu de culture par un autre milieu plus approprié pour les expériences, l'échantillon peut être centrifugé après l'étape de culture pendant 5 minutes à 10 000 rpm (à exprimer en g). Le culot de micro-organismes est ensuite redispersé dans le milieu approprié.

<sup>1.</sup> Tryptic Soy Agar

#### A.3.5 Utilisation de bactéries fluorescentes

Pour les besoins de certaines expériences, notamment lorsque les conditions de surface des microsystèmes étaient mauvaises et qu'il était difficile d'observer directement les bactéries au microscope, nous avons utilisé les bactéries *E. coli* génétiquement modifiées (*E. coli* BL21 Ril) capables d'intégrer à leur génome un plasmide après une étape dite de transformation (le protocole utilisé est donné en Annexe A.3.5).

Ce plasmide contient deux gènes d'intérêt : un gène codant pour une protéine fluorescente (rouge pour le plasmide pDSred, verte pour le plasmide pGFP), et un gène de résistance à l'ampicilline.

### A.3.6 Protocole de transformation

Pour obtenir des bactéries transformées, nous avons utilisé le protocole suivant :

- Prélever 50 µde solution bactérienne commerciale.
- Ajouter 1 μL de plasmides.
- Incuber 30 minutes dans la glace.
- Faire un choc thermique, pendant 30 secondes à 42°C.
- Laisser 2 minutes dans la glace.
- ajouter 250 μL de milieu de culture froid.
- Incuber pendant une heure à 37°C sous agitation.
- Etaler 100  $\mu$ L de la solution sur une boite d'agar contenant de l'ampicilline (100 $\mu$ L/mL).

#### A.3.6.1 Culture et conservation

La préparation des suspensions de bactéries fluorescentes se fait selon le même protocole que les bactéries non-fluorescentes, mais de l'ampicilline est ajoutée au milieu de culture (100µg/mL), pour permettre la sélection des seules bactéries qui ont intégré le plasmide.

La conservation de ces bactéries sur boîte se limite à une semaine au lieu de trois dans le cas des bactéries non-transformées, car passé ce délai, une grande partie des bactéries transformées perdent leur plasmide pGFP ou pDSred et n'ont donc plus la capacité à produire la protéine fluorescente.

# **B** Méthodes de caractérisation des échantillons biologiques

## B.1 Dénombrement par comptage sur boîte

Pour connaître le nombre de micro-organismes dans un échantillon, une méthode standard de laboratoire consiste à effectuer un *comptage sur boîte*. Cette méthode consiste à étaler une fraction de la solution (généralement 100  $\mu$ L) sur une boîte d'agar, puis de placer la boîte d'agar dans un incubateur à 37 °C pendant 24h. Chaque micro-organisme isolé sur la boîte d'agar va former une colonie visible à l'œil nu. Le dénombrement des colonies sur la boîte permet de remonter au nombre de micro-organismes dans l'échantillon de départ. Lorsque l'échantillon est très concentré, il peut être dilué avant d'être étalé sur boîte, afin d'obtenir au final entre 30 et 300 micro-organismes sur la boîte. Au-delà de 300, le comptage est moins précis, car les colonies risquent de ne plus être vraiment isolées. En général, comme la concentration de l'échantillon n'est pas connue en avance, plusieurs dilutions successives de l'échantillon sont étalées sur différentes boîtes, pour ne pas avoir trop ou trop peu de micro-organismes sur les boîtes.

Cette méthode permet donc de déterminer le nombre de ufc d'un échantillon, c'est-à-dire le nombre de micro-organismes vivants capables de se diviser et de former une colonie lorsqu'ils sont étalés sur une boîte de culture. La valeur de la concentration n'est connue que 24h après, puisqu'il faut attendre que les micro-organismes se divisent pour pouvoir compter à l'œil nu le nombre de colonies formées.

## B.2 Dénombrement par densité optique

Si l'on souhaite calibrer la concentration d'un échantillon avant une expérience, on peut aussi mesurer sa densité optique (DO) à 550 nm avec un spectrophotomètre. Cette mesure d'absorbance est proportionnelle au nombre de micro-organismes en solution. Le facteur de proportionnalité entre la valeur de la DO et la concentration en micro-organismes de la solution est spécifique à chaque espèce (tableau B.1). Les facteurs de proportionnalité ont été déterminés en interne au laboratoire en effectuant des comptages sur boîte de suspensions bactériennes dont la DO était connue.

Tableau B.1 – Tableau de conversion entre concentration et densité optique pour chacun micro-organisme de notre modèle biologique (données internes du laboratoire)

espèce	DO à 550 nm	concentration
E. coli	0.1	5 10 <sup>7</sup> ufc/mL
S. epidermidis	0.1	2.3 10 <sup>7</sup> ufc/mL
C. albicans	0.1	1.5 10 <sup>6</sup> ufc/mL

Cette méthode est très utile car elle permet de connaître instantanément la concentration en microorganismes, mais ne permet pas de faire la différence entre les micro-organismes vivants ou morts, et ne peut pas être utilisée avec un échantillon complexe, comme un mélange de bactéries et de globules rouges.

## B.3 Marqueur de viabilité : intercalant IP / SYTO9

Pour déterminer l'état physiologique d'une bactérie, on peut utiliser le kit Live/Dead BacLight (Invitrogen). Ce kit contient du SYTO9 et de l'iodure de propidium (IP), qui sont des fluorochromes qui s'intercalent entre les acides nucléiques. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des deux molécules sont données dans le tableau B.2.

Tableau B.2 – Longueurs d'onde d'excitation et d'émission du SYTO9 et de l'iodure de propidium

longueur d'onde d'excitationlongueur d'onde d'émissionSYTO9488 nm500 nmIP488 nm620 nm

Le protocole de marquage consiste à mélanger 100  $\mu$ L de suspension bactérienne (de concentration 10<sup>7</sup> ufc/mL) avec 1.5  $\mu$ L de solution de SYTO9 (de concentration 0.3 mM) et 1.5  $\mu$ L de solution d'IP (de concentration 2 mM), puis de laisser incuber 15 minutes dans le noir à température ambiante.

Le SYTO9 (vert) peut pénétrer dans la cellule quel que soit l'état de la membrane, alors que l'IP (rouge) ne peut y pénétrer que si la membrane est endommagée. Observée avec un microscope à fluorescence, la bactérie apparaitra donc verte lorsque sa membrane est intègre, et rouge si sa membrane est endommagée.

## B.4 Marqueur du noyau des globules blancs : SYTO9

Le SYTO9 a aussi été utilisé pour marquer le noyau des globules blancs, en mélangeant 1.5 mL de solution de SYTO9 à 100µL de sang.