



HAL
open science

Contribution à l'élaboration d'une plateforme miniaturisée de test en routine du pouvoir infectieux d'agents pathogènes: application à *Cryptosporidium* sp.

Romuald-Alexis Lejard-Malki

► To cite this version:

Romuald-Alexis Lejard-Malki. Contribution à l'élaboration d'une plateforme miniaturisée de test en routine du pouvoir infectieux d'agents pathogènes: application à *Cryptosporidium* sp.. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2012. Français. NNT: . tel-00738714

HAL Id: tel-00738714

<https://theses.hal.science/tel-00738714>

Submitted on 4 Oct 2012

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.



Université
Lille1
Sciences et Technologies

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**
spécialité Micro et nanotechnologies, acoustique
et télécommunications



**PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT PAR
ROMUALD-ALEXIS LEJARD MALKI
LE 24 FÉVRIER 2012**

**CONTRIBUTION À L'ÉLABORATION D'UNE PLATEFORME
MINIATURISÉE DE TEST EN ROUTINE DU POUVOIR INFECTIEUX
D'AGENTS PATHOGÈNES : application à *Cryptosporidium sp.***

DIRECTEUR DE LA THÈSE : Dr Vincent Senez, Directeur de Recherche, CNRS, Lille, France

RAPPORTEURS : Dr Eric Leclerc, CR CNRS, HDR, Université Technologique de Compiègne, France
Prof. Marc Desmulliez, Prof., Université Heriot-Watt, Edimbourg, Ecosse

EXAMINATEURS : Prof. Tuami Lasri, Prof., Université de Lille 1, Lille, France
Dr Jean-François Chateaux, MdC, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Lyon, France
Dr Jérôme Follet, Enseignant-Chercheur, Groupe ISA, Lille, France (co-encadrant)

INVITÉS : Dr Eduardo Dei-Cas, Directeur de recherche, Institut Pasteur de Lille, France
Dr Stéphane Leprêtre, Chargé d'Affaires à Eurasanté, Lille, France

A mon frère aimé Abdellah Malki,

A mon grand père maternel Mahdi Malki

Remerciements

Ce doctorat à forte composante interdisciplinaire a été financé par la région Nord Pas de Calais, la Fondation Norbert Ségard, l'Institut Supérieur de l'Electronique et du Numérique, la Faculté Libre des Sciences et Technologies et l'Institut Supérieur de l'Agriculture, dans le cadre du projet « Nanobiosciences » soutenu par l'Université Catholique de Lille.

Je tiens tout d'abord à remercier ces acteurs pour avoir contribué au financement de ma thèse, et plus particulièrement Pierre Giorgini, directeur de l'ISEN, de m'avoir accepté en tant que salarié de sa structure. Je remercie également Alain Cappy et Lionel Buchaillet, qui ont été successivement les Directeurs de l'IEMN, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Plus particulièrement Lionel Buchaillet qui m'a accueilli dans son groupe lors de mon stage de Master.

Je remercie Tuami Lasri, Professeur à l'Université de Lille Nord de France, d'avoir accepté d'examiner ce travail. J'adresse également mes remerciements au Dr Eric Leclerc, Chargé de recherche CNRS, de l'Université Technologique de Compiègne (France) et au Prof. Marc Desmulliez de l'Université Heriott Watt (Edimbourg, Ecosse) pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. J'exprime ma reconnaissance au Dr Stéphane Leprêtre, Chargé d'Affaires à Eurasanté (Lille, France), au Dr Jérôme Follet, Enseignant-Chercheur au Groupe ISA (Lille, France) et au Dr Eduardo Dei-Cas, Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Lille (France) pour avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche.

Plus particulièrement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr Vincent Senez, directeur du groupe BioMEMS à l'IEMN, avant tout pour son humanité. Il m'a d'abord accordé sa confiance lors d'un stage préliminaire puis s'est démené pour obtenir une bourse de thèse. Il a dirigé mes travaux et m'a accompagné dans les moments douloureux qui ont jalonné cette aventure. Pour tout cela, je te suis sincèrement reconnaissant.

Avec le même degré de sincérité, je remercie chaleureusement le Dr Jérôme Follet pour son apport considérable et son aide précieuse, notamment sur les problématiques expérimentales. Il a toujours été source d'optimisme, et a profondément valorisé ce travail grâce à son expertise en parasitologie. La bière que je te dois, non, je n'ai pas oublié !

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de biotechnologies et des microorganismes de l'ISA qui m'ont accueilli et aidé lors des expériences avec le parasite *C. Parvum*: Caroline Deweer, Patrice Halama, Ourida Hammouma, Ali Siah, Anne Follet-Dumoulin.

Bien entendu, je remercie chaleureusement les membres du groupe BioMEMS : Vincent Thomy, Renaud, Simon, Anthony, Chang, Magalie, Guillaume (partenaire de bureau, futur politologue économiste ? merci pour les quelques discussions), et les nouveaux venus Alexis, Alfred (keep going !), Sébastien (tu me prêtes ton casse-tête !), Alain (mention spéciale pour le breuvage à base de feuille de bissap !). J'ai une pensée particulière teintée d'amitié pour les plus anciens comme Maxime, ainsi que certains qui ont quitté le groupe pour prendre leur envol vers de nouveaux cieux. Je pense à Florian Lapière, fidèle collègue de bureau et ami : je pense aux pintes, aux barbecues à base de côte à l'os, aux légumes du jardin, aux cerises fraîchement mûries, aux échanges de lectures. Je pense à Damien Debuisson pour son ouverture d'esprit, sa gentillesse, sa bonne humeur. Je pense à Timothée Houssin avec qui nous avons partagé un voyage extraordinaire en Serbie avec Kamel Madjour (GAS GAS !!!). Je pense également à François Brunel et les quelques bonnes soirées où tu m'as convié. Je pense à Nhung N'Guyen pour sa gentillesse et sa cuisine vietnamienne succulente. Je n'oublie pas Jimmy behaegel pour son aide précieuse lors du stage qu'il a effectué à mes côtés.

Je dis merci aux collègues d'opto avec qui j'ai partagé quelques très bons moments : Arnaud, Floriane, Djamila, Antoine, Christophe, Thomas. Je tiens à remercier les quelques joyeux drilles de la salle blanche avec qui j'ai bien ri et aussi échangé : petit mignon Alex, pec Salim, Benjamin, Hermance, Virginie et compagnie. Je n'oublie pas les sympathiques membres du groupe NAM6 : Bernard Legrand et Steve Arscott pour leur bienveillance, Thomas Dargent, Roger Ringot.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire, qui ont de près ou de loin, partagé cette expérience avant tout humaine : Pascal Tilmant pour son amitié (de longue date !) tout en discrétion, Yannick Coffinier et David Guerin pour leurs apports scientifiques en chimie, Rabba Boukherroub et Farzam Zouhestiagh pour leur sourire.

Je tiens à remercier également Christophe Timonier pour l'aide ultra efficace concernant l'usinage des pièces (un grand merci à toi !) et Jean Michel Mallet pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à remercier grandement Ted Gretkowski pour la création graphique du logo du groupe BioMEMS, à titre gracieux. Il a effectué un travail remarquable. Sa qualité a séduit de façon unanime tous les membres du groupe. Pour cette contribution artistique de talent, qui plus est « free » (à l'image de ton état d'esprit), je te remercie du fond du cœur, aux noms de tous les membres du groupe. Egalement merci pour la couverture que tu as créé pour ce manuscrit (Ted Gretkowski, contact@yakacommunication.fr, Directeur Artistique Freelance)

Merci aux coéquipiers du futsal grâce à qui je me suis épanoui dans la joie du sport, la beauté du geste de Kamel, les frappes en bout de course de Romain (souvent hors cadre ! je chambre), les courses marathoniennes de Malek, la défense impeccable de Mathieu, les gueulantes mémorables de Tristan, les grigris parfois superflus de Saïd, les raids solitaires de Nico, les passes manquées de Rezki (tu as progressé ! respect), les cris aigus d'Albert lorsqu'il chute !

Toujours dans le volet sport, je remercie Philippe Brunet et Etienne Hert d'avoir joué au squash avec moi, et de m'avoir permis de progresser, beaucoup progresser ! Quand vous voulez pour quelques parallèles et nick bien senti. Etienne, essaie de bien manger avant de jouer ;)

Enfin, je remercie mes proches, tout proche, très proche. Ma compagne, mes parents, ma famille, ma belle famille. Ces remerciements ont d'autant plus de poids qu'ils sont exprimés avec le plus profond de mon cœur. Ils sont exprimés avec le souvenir aussi. Le souvenir d'êtres chers, très chers.

Mon grand père. Mon frère.

Résumé

Ce travail de recherche porte sur le développement d'une plateforme microfluidique de type laboratoire sur puce pour la mesure du pouvoir infectieux d'agents pathogènes présents dans l'eau. La principale fonction étudiée dans ce manuscrit est la concentration de parasites en suspension dans un liquide. La manipulation des microparticules est basée sur l'emploi de forces électrocinétiques. Une analyse numérique en deux et trois dimensions apporte des informations qualitatives. Elle permet également d'extraire les valeurs géométriques clés des électrodes employées pour la concentration des microparticules. Ces premiers résultats théoriques sont confirmés expérimentalement à l'aide de deux dispositifs contenant une grande variété de concentrateurs. A partir des éléments théoriques et expérimentaux, nous concevons un concentrateur optimisé. Il est intégré dans un dispositif employant la technique de déplacement de goutte par électromouillage sur diélectrique (EWOD). Ce système est employé selon trois modes : concentrateur, extracteur et séparateur. Des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia lamblia* sont utilisés pour la caractérisation du dispositif. Enfin, des résultats préliminaires de cultures cellulaires sur des surfaces fonctionnalisées à l'échelle de la centaine de micromètres permettent d'envisager le développement d'une plateforme microfluidique complète d'analyse du pouvoir infectieux d'agents pathogènes du genre *Cryptosporidium*.

Résumé en anglais

This work focuses on the development of a microfluidic platform (lab on a chip) for the measurement of pathogens infectivity in water. The main function studied in this manuscript is the concentration of parasites suspended in a liquid. The manipulation of microparticles is based on the use of electrokinetic forces. Numerical analysis in two and three dimensions provides qualitative information. It can also extract the geometric key values of electrodes used for the concentration of the microparticles. These theoretical results are confirmed experimentally using two devices containing a wide variety of concentrators. From the theoretical and experimental results, we design an optimized concentrator. It is integrated in a system allowing droplet motion by electrowetting on dielectric (EWOD). This system is used in three modes: concentrator, extractor and separator. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia lamblia* cysts are used for the characterization of the device. Preliminary results of cell culture on surfaces functionalized at scale of hundreds of microns allow to consider the development of a complete microfluidic platform for infectivity analysis of pathogenic agent such as *Cryptosporidium*.

Table des matières

Introduction Générale.....	27
1 : L'environnement, l'eau, et les Lab-On-Chip. Vers un nouveau système de mesure du pouvoir infectieux.....	33
1.1 Préambule	35
1.2 L'environnement et l'eau.....	38
1.2.1 Management de l'eau : contrôler pour mieux gérer	39
1.2.2 Quelques méthodes de détection « classiques ».....	41
1.2.2.1 Les micropolluants non-vivants	42
1.2.2.2 Les microorganismes.....	43
1.2.2.3 Conclusion partielle.....	46
1.3 La microfluidique et les Lab-On-Chip : applications dans le domaine de l'eau ..	48
1.3.1 Détection de micropolluants inorganiques	49
1.3.2 Détection d'agents pathogènes.....	52
1.3.2.1 Préambule.....	52
1.3.2.2 Quelques exemples.....	54
1.4 <i>Cryptosporidium sp.</i> : Problématique et outils	56
1.4.1 <i>Cryptosporidium sp.</i> : Un problème de santé publique.....	56
1.4.2 Les outils actuels de détection du parasite	58
1.4.3 La viabilité et le pouvoir infectieux	60
1.4.4 Les outils miniaturisés.....	62
1.5 Un Lab-On-Chip comme solution d'analyse du pouvoir infectieux	64
.....	64
Bibliographie du chapitre 1.....	67
2 : Présentation des fonctions du système, des technologies employées et premiers résultats de concentration	83
2.1 Préambule	85
2.2 L'électromouillage sur diélectrique : EWOD.....	87
2.2.1 Principe de l'électromouillage sur diélectrique.....	88

2.2.1.1	Equation de Lippmann-Young	88
2.2.2	Electromouillage pour le déplacement de goutte	89
2.2.3	L'hystérésis	92
2.2.4	Discussion sur la création de goutte	94
2.2.5	Quelques applications EWOD pour les laboratoires sur puce et la microfluidique.	96
2.3	Manipulations de microparticules en milieu liquide.....	99
2.3.1	Principe Force-Vitesse	100
2.3.2	Les techniques de manipulation employant l'action sur la particule.	101
2.3.2.1	La diélectrophorèse	101
2.3.2.2	Quelques autres forces	104
2.3.3	Techniques de manipulation employant l'action du liquide	105
2.3.4	Techniques combinant la force exercée sur la microparticule et le déplacement du liquide	107
2.4	Techniques de concentration mettant en jeu l'EWOD	113
2.4.1	EWOD et manipulation magnétique	113
2.4.2	EWOD et manipulation optique	115
2.4.3	EWOD et manipulation électrique	117
2.4.4	Objectifs du travail de doctorat	119
2.5	Spécifications du système et résultats préliminaires.....	121
2.6	Conclusion.....	126
	Bibliographie du chapitre 2.....	127
3	: Modélisation et simulation du concentrateur.....	137
3.1	Préambule	139
3.2	Introduction	140
3.3	Bilan des forces	143
3.3.1	Forces électrocinétiques AC.....	143
3.3.1.1	La force diélectrophorétique	143
3.3.1.2	La force d'électroconvection.....	150
3.3.1.3	La force électro-osmotique.....	153
3.3.2	Autres forces	158
3.3.2.1	La force de gravité, la poussée d'Archimède et le mouvement Brownien	158

3.3.2.2	Force hydrodynamique.....	161
3.3.2.3	Bilan des forces	162
3.4	Les simulations par éléments finis	165
3.4.1	Plateforme de simulation.....	166
3.4.2	Construction des modèles 2D et 3D.....	167
3.4.3	Résultats des simulations 2D.....	174
3.4.3.1	Influence du couple (σ , V) et de la géométrie (e et w) sur la température.	176
3.4.3.2	Influence de la fréquence du signal et de la géométrie (e et w) sur l'électro-osmose	178
3.4.3.3	Influence de la géométrie (e et w) sur la hauteur de lévitation	182
3.4.3.4	Conclusion sur le modèle 2D	191
3.4.4	Résultats des simulations 3D.....	193
3.4.4.1	Influence de la conductivité électrique du liquide	197
3.4.4.2	Influence de la géométrie (e).....	199
3.5	Conclusion.....	202
	Bibliographie du Chapitre 3.....	206
4	: Résultats expérimentaux	211
4.1	Préambule	213
4.2	Etude multiparamétrique du concentrateur.....	215
4.2.1	Objectifs	215
4.2.2	Présentation du banc de test	216
4.2.3	Procédés de micro-fabrication.....	219
4.2.3.1	Fabrication du dispositif de concentration avec réservoir en SU8.....	219
4.2.3.2	Dépôt et recuit pour la micro-structuration de la résine SU8-2075	220
4.2.4	Méthodologie de l'expérience	223
4.2.5	Observations et discussion du dispositif multi-puits.....	224
4.2.5.1	Observations et discussion	224
4.2.5.2	Conclusion.....	230
4.3	Le concentrateur optimisé	233
4.3.1	Objectifs	233
4.3.2	Procédés de micro-fabrication.....	234
4.3.3	Méthodologie des expériences	237

4.3.4	Observations et discussion du concentrateur optimisé.....	238
4.3.4.1	Observations.....	238
4.3.4.2	Discussion	241
4.4	L'extracteur	244
4.4.1	Objectifs	244
4.4.2	Présentation du banc de test	244
4.4.3	Micro-fabrication du capot super hydrophobe	246
4.4.3.1	Etapas de fabrication du capot	247
4.4.3.2	Gravure des nanofils par voie chimique.....	248
4.4.4	Observations et discussion	250
4.4.4.1	Observations.....	250
4.4.4.2	Discussion	253
4.5	Le séparateur	256
4.5.1	Intérêt de séparer des espèces en biologie.....	256
4.5.2	Objectifs	257
4.5.3	Dispositifs et méthodes	258
4.5.4	Observations et discussion	259
4.5.5	Conclusion.....	262
4.6	Le détecteur	264
4.6.1	Fabrication des motifs de culture cellulaire	264
4.6.2	Culture cellulaire	266
4.7	Conclusion.....	271
	Bibliographie du chapitre 4.....	273
5	: Conclusion générale et perspectives.....	275
5.1	Conclusion Générale	276
5.2	Vers une plateforme de diagnostic de maladies parasitaires et d'étude de médicaments et désinfectants	280
	Annexes.....	283
	Annexe A : Problématique du poly-parasitisme au niveau générique	285
A.1	Problématique du poly-parasitisme au niveau spécifique : exemple de <i>Cryptosporidium spp</i> chez l'homme et le veau.....	286
A.2	Les limites techniques en situation de co-infestation	287

Annexe B : Matériel et méthode pour la culture cellulaire	289
B.1 Condition de culture	289
B.2 Congélation/décongélation des cellules.....	290
Bibliographie de l'annexe	291

Liste des symboles et abréviations

\vec{D}	Vecteur d'induction électrique	(C.m ⁻²)
\vec{E}	Vecteur champ électrique	(V.m ⁻¹)
\vec{j}	Vecteur densité de courant	(A.m ⁻²)
\vec{n}	Vecteur normal	
\vec{v}_f	Vitesse du fluide	
\vec{v}_p	Vitesse de la particule	
\vec{v}_{slip}	Vitesse de glissement	
\vec{F}_A	Poussée d'Archimède	
\vec{F}_{dep}	Force diélectrophorétique	
\vec{F}_f	Force de freinage visqueux de Stokes	
\vec{F}_g	Force de gravité	
\vec{F}_{grav}	Bilan de la force de gravité et de la poussée d'Archimède	
\vec{F}_{total}	Combinaison des trois forces \vec{F}_{dep} , \vec{F}_{trai} et \vec{F}_{grav}	
\vec{F}_{trai}	Force due à la combinaison des effets électrothermique AC et électroosmotique	
c	Concentration molaire	(mol.L ⁻¹)
c_p	Capacité calorifique	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
d	Distance entre la base et le capot du système EWOD 3D (ou hauteur de goutte)	
e	Espace inter électrodes	

f	Fréquence (Hz)
f_e	Force électrique
F_H	Force d'hystéris (électromouillage)
F_m	Force motrice (électromouillage)
fCM	Facteur de Clausius-Mossotti
g	Accélération de la pesanteur (m.s^{-2})
h	Hauteur de lévitation (m)
h_T	Coefficient de transfert thermique ($\text{W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$)
k	Facteur de forme du colloïde
k_B	Constante de Boltzman ($1.3806503.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
k_T	Conductivité thermique du milieu ($\text{W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
K_S	Conductance surfacique (S)
l	Longueur caractéristique du système (m)
L	Largeur du domaine de simulation 2D
$L_{\text{élec}}$	Longueur d'une électrode du concentrateur (m)
L_{ewod}	Largeur d'une électrode EWOD
N	Nombre d'électrodes actionnées pour la création de goutte
P	Pression à l'intérieur de la goutte (Pa)
P_d	Pression à droite de la goutte
P_g	Pression à gauche de la goutte

r	Rayon de la particule (m)
R_0	Rayon de courbure de la goutte quand $V=0$
R_c	Taille critique du colloïde
Re_y	Nombre de Reynolds
$R(V)$	Rayon de courbure de la goutte quand $V \neq 0$
t	Épaisseur de la couche diélectrique (m)
T	Température (K)
T_{ext}	Température à l'extérieur de la goutte
v	Vitesse ($m \cdot s^{-1}$)
v_{eoo}	Vitesse électroosmotique
V	Tension (V)
V_e	Tension d'excitation (V)
V_d	Chute de potentiel au niveau de la double couche capacitive (couche diffusive et couche de Stern)
w	Largeur d'une électrode
γ	Tension de surface liquide/gaz
ϵ_0	Permittivité du vide ($8,854187817 \cdot 10^{-12} F \cdot m^{-1}$)
ϵ	Permittivité relative (indice p : particule, indice m : milieu)
ϵ^*	Permittivité relative complexe (indice p : particule, indice m : milieu)
λ_d	Longueur de Debye (m)
μ	Viscosité dynamique du fluide ($Pa \cdot s, kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$)

π	Nombre Pi
ρ	Densité de charge (C.m ⁻¹)
ρ_m	Masse volumique du milieu (kg.m ⁻³)
ρ_p	Masse volumique de la particule (kg.m ⁻³)
σ	Conductivité électrique du milieu (S.m ⁻¹)
σ_p	Conductivité électrique de la particule (S.m ⁻¹)
τ	Temps de relaxation (s)
θ_0	Angle de contact de Young
$\theta(V)$	Angle de contact en fonction de la tension appliquée
θ_a	Angle de contact apparent à l'avancée
θ_r	Angle de contact apparent de reculée
ω	Pulsation (rad.s ⁻¹)
m/Z	Masse moléculaire / Charge de la molécule
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
μ L	Microlitre
nL	Nanolitre
ppb	Partie par milliard
s	Seconde

AgNO ₃	Nitrate d'argent
Al ₂ O ₃	Alumine ou oxyde d'aluminium
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cr ⁶⁺	Chrome hexavalent
H ₂ O	Eau
HCl	Acide chlorhydrique
HF	Acide fluorhydrique
HNO ₃	Acide nitrique
O ₂	Dioxygène
AC	Courant alternatif (de l'anglais Alternating Current)
ACET	Electrothermique AC
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPERES	Projet : Analyse des Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux de Surface
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Caco-2	Cellules d'adénocarcinome du colon humain
CDC	Centre de contrôle des maladies aux Etats-Unis (de l'anglais Center for Diseases Control)

<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i> (espèce parasitaire spécifique des bovins)
<i>C. muris</i>	<i>Cryptosporidium muris</i> (espèce parasitaire spécifique des souris)
<i>C. hominis</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i> (espèce parasitaire spécifique des hommes)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEP	Diélectrophorèse
C-DEP	Diélectrophorèse sans contact (de l'anglais Contactless DEP)
E-DEP	Diélectrophorèse sans électrode (de l'anglais Electrodeless DEP)
L-DEP	Diélectrophorèse latérale (de l'anglais Latéral DEP)
nDEP	Diélectrophorèse négative
pDEP	Diélectrophorèse positive
tw-DEP	Travelling wave dielectrophoresis
DMEM	Milieu de Dulbecco modifié
DMSO	DiMethylSulfoxide
ECACC	European Collection of Cell Culture
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDI	Eau désionisée
EHD	Electrohydrodynamique
EOO	Electroosmose
EWOD	Electromouillage sur diélectrique (de l'anglais ElectroWetting On Dielectric)
FISH	Hybridation in situ en fluorescence (de l'anglais Fluorescence In Situ Hybridization)

GSM	Global System for Mobile Communications
HCT-8	Cellules issues d'adénocarcinome Iléo-caecal humain
IDT	Transducteur interdigité (de l'anglais InterDigitated Transducer)
ITO	Oxyde d'indium-étain (de l'anglais indium tin oxyde)
KCl	Chlorure de potassium
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (en français : amplification de la lumière par émission stimulée de rayonnement)
LOC	Lab-On-a-Chip (en français : laboratoire sur puce)
LT CD ₄	Lymphocytes T CD ₄
MDCK	Cellules épithéliales rénales canines (de l'anglais Madine-Darby canine kidney)
MEMS	Microsystème (de l'anglais micro-electro-mechanical systems)
MicroTAS	Microsystème à analyse totale (de l'anglais micro total analysis systems)
OET	Pinces Optoélectroniques (de l'anglais OptoElectronic Tweezers)
OEW	Opto-électromouillage (de l'anglais Opto ElectroWetting)
OTS	Octadecyltrichlorosilane
ONU	Organisation des Nations Unies
PBS	Tampon phosphate salin (de l'anglais phosphate buffered saline)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (de l'anglais polymerase chain reaction)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
pH	Potentiel hydrogène

PI	Iodure de Propidium
PMMA	Polyméthacrylate de méthyl
POCT	Point-Of-Care Testing (équivalent à : Analyse au chevet du patient)
QCM	Microbalance à quartz (de l'anglais quartz microbalance)
REP	Modelage électrocinétique rapide (de l'anglais Rapid Electrokinetic Patterning)
RPM	Rotation par minute
RT-PCR	PCR après transcription inverse
SAW	Onde acoustique de surface (de l'anglais surface acoustic wave)
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
<i>sp.</i>	Specie pour évoquer une espèce
<i>spp.</i>	Species pour évoquer plusieurs espèces
SPR	Résonance des plasmons de surface (de l'anglais Surface Plasmon Resonance)
USEPA	Agence de protection de l'environnement des Etats Unis (de l'anglais United State Environmental Protection Agency)
UV	Ultra-violet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHO	World Health Organization (en français : Organisation Mondiale de la Santé)

Tableau des valeurs employées lors des simulations 2D et 3D

ε_0	Permittivité du vide	F.m ⁻¹	8,854.10 ⁻¹²
ε_m	Permittivité relative du milieu		80,2
ε_p	Permittivité relative de la particule		2,5
λ_d	Longueur de Debye	m	1.10 ⁻⁹
μ	Viscosité dynamique du fluide	kg.m ⁻¹ .s ⁻¹	1,08.10 ⁻³
ρ_m	Masse volumique de l'eau	kg.m ⁻³	999
ρ_p	Masse volumique de la particule	kg. m ⁻³	1050
$\sigma_{total} = \sigma_p + 2 \frac{K_s}{r}$	Conductivité de la particule ($\sigma_p = 0$ S.m ⁻¹)	S.m ⁻¹	1,10 ⁻⁴ S. m ⁻¹ pour $r=5\mu\text{m}$
c_p	Capacité calorifique	J.kg ⁻¹ .K ⁻¹	4,184.10 ³
h_T	Coefficient de transfert thermique	W.m ⁻² .K ⁻¹	1000
K_s	Conductance surfacique	S	0,25.10 ⁻⁹
k_T	Conductivité thermique du fluide	W. m ⁻¹ .K ⁻¹	0,598
r	Rayon de la particule	m	5.10 ⁻⁶

Introduction Générale

La technologie des laboratoires sur puce (Lab-On-a-Chip, LOC) est sur le point de changer le domaine de l'analyse et du diagnostic. Un laboratoire sur puce est un dispositif intégrant des fonctions de laboratoire sur un substrat miniaturisé. Bien que de nombreux groupes académiques travaillent sur les applications futures des LOC, la pénétration sur le marché est encore faible.

Les systèmes LOC programmables sont les plus prometteurs car ils confèrent une souplesse d'utilisation accrue. Les systèmes dits de microfluidique digitale sont des dispositifs capables d'effectuer des opérations de déplacement, création, scission et fusion de gouttes dont le volume peut varier du nanolitre à la dizaine de microlitres. Advanced Liquid Logic est une compagnie industrielle spécialisée dans le développement d'outils de ce type.

La puissance de ces outils réside dans la possibilité d'automatiser et de paralléliser des fonctions d'analyse sur des échantillons de faibles volumes. De plus, l'intégration sur puce est aisée car les techniques employées sont de type électrique.

Alors que de nombreux systèmes très spécifiques et mono-fonction sont développés dans le monde entier, le plus grand défi est de proposer une solution d'analyse complète, intégrant sur une puce toutes les étapes classiques élaborées en laboratoire.

Les innovations de type Lab-on-a-chip possèdent un fort potentiel applicatif dans les domaines de l'analyse du sang, de la cancérologie, de la détection de virus et de bactéries ou encore du contrôle environnemental. En 2009, le marché des LOC est estimé à 817 millions de dollars. Les spécialistes prévoient une croissance annuelle de plus de 20% pour dépasser les 2 milliards de dollars en 2014¹.

La qualité et le contrôle de l'eau sont des préoccupations environnementales importantes. Les LOC sont des outils capables de répondre aux nouveaux enjeux de gestion de l'eau posés par le développement technologique de nos sociétés. Les polluants et pathogènes émergents sont les nouvelles cibles des outils de détection d'aujourd'hui et de demain.

¹ Site web : Note de marché. Eco-Activités N° 14 - septembre 2010. http://www.ardi-rhonealpes.fr/c/document_library/get_file?uuid=ef54ecc2-23d7-4431-beff-e79df900339e&groupId=10136

Parmi les agents pathogènes importants, les parasites du genre *Cryptosporidium* font l'objet de plus en plus d'attention. Les sources de contamination sont majoritairement les excréments humains (eaux usées) et animaux (lisiers des fermes d'élevages). Ce parasite est au cœur des préoccupations à venir, comme l'atteste l'attribution, en Juin 2009, d'une bourse de 2 millions de dollars par l'EWIDC (Environment and Water Industry Development Council) pour le développement d'un outil de détection rapide de *Cryptosporidium sp.* à partir de 10L d'eau de boisson en moins d'une heure².

Dans ce contexte, nous proposons, par ce travail de thèse, une contribution au développement d'une plateforme d'analyse, de type laboratoire sur puce, du pouvoir infectieux d'ocystes de *Cryptosporidium*. A terme, cette plateforme a pour objectif la mesure électrique de l'infection, par des parasites, de tapis cellulaires cultivés en microenvironnement, de manière automatisée.

Ainsi, dans le chapitre 1, nous commençons par poser la problématique de l'eau et de sa gestion. Nous présentons les principales techniques de détection d'agents polluants, vivants et non-vivants, puis explorons les apports des technologies basées sur la microfluidique et les laboratoires sur puce. Ensuite, nous nous focalisons sur le parasite du genre *Cryptosporidium*, qui présente un réel problème de santé publique. Après avoir fait un état des lieux des techniques de détection, nous proposons un nouvel outil de mesure du pouvoir infectieux de ce parasite, capable de remplacer les standards actuels.

Le chapitre 2 présente les différentes fonctions qui composent la plateforme. Les fonctions principales sont la manipulation et la concentration des parasites en suspension dans un volume de quelques microlitres, et le déplacement de gouttes de quelques centaines de nanolitres. La technologie de déplacement de goutte par électromouillage est expliquée. Nous faisons un tour d'horizon des différentes techniques de manipulation de microparticules en microenvironnement. Enfin, nous présentons les premiers résultats de concentration du parasite effectués grâce à l'application d'un champ électrique généré par des électrodes

² Site web : http://nocweba.ntu.edu.sg/laq_mems/media.htm

planaires. Ces observations préliminaires font état d'une importante influence des paramètres géométriques des électrodes sur le pouvoir concentrateur du système.

A la lumière des premiers résultats de concentration, le chapitre 3 expose les travaux de simulations numériques du système concentrateur. Nous présentons les équations régissant les phénomènes électrocinétiques impliqués lors du processus de rassemblement des particules en suspension dans un électrolyte. Deux approches, en deux et trois dimensions, sont effectuées. L'analyse des résultats de simulation permet d'obtenir une gamme de paramètres favorables au rassemblement des particules. A l'issue de ce travail, la géométrie des électrodes est optimisée afin qu'elle soit compatible avec la technique d'électromouillage.

Le chapitre 4 présente les résultats d'expérimentations de deux dispositifs. Le premier est un dispositif multi-puits ayant pour but de valider les informations obtenues par la simulation numérique, par l'expérimentation de diverses tailles et formes d'électrodes. Cette étude apporte des éléments cruciaux pour le redimensionnement des électrodes. Le deuxième dispositif est le système optimisé, employé suivant 3 modes : concentrateur, extracteur et séparateur. Les étapes technologiques de micro-fabrication sont présentées, ainsi que les bancs et protocoles expérimentaux. Ainsi, le système présente la possibilité de concentrer un échantillon de parasites à partir d'un volume initial de quelques μL , et d'extraire ces parasites dans un volume final de 800nL . Dans la perspective d'étude du poly-parasitisme, il est également capable de séparer différents genres voire différentes espèces de parasites. Enfin, les résultats préliminaires de cultures de cellules sur des surfaces micro-différenciées sont présentés.

Ces travaux contribuent au développement d'une plateforme globale, dont la suite est en cours de développement depuis le 1^{er} Novembre 2011, avec le travail de doctorat de Monsieur Alfred Dibao-Dina.

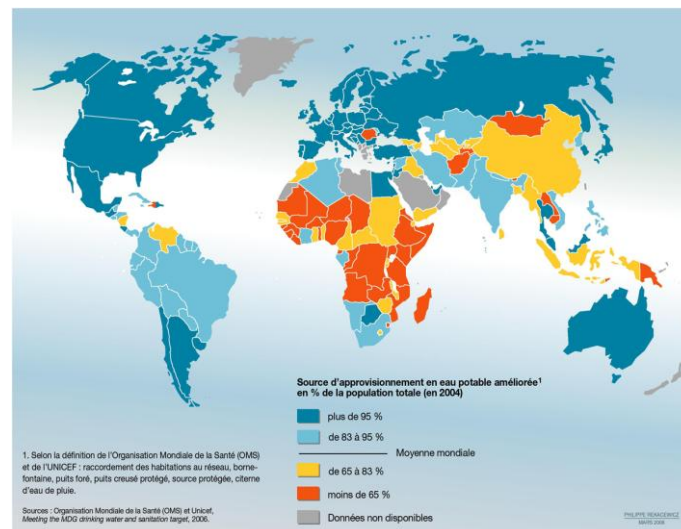
1 : L'environnement, l'eau, et les Lab-On-Chip. Vers un nouveau système de mesure du pouvoir infectieux

1.1 Préambule

La qualité de l'eau et le traitement des eaux usées sont des préoccupations majeures de notre société. Elles sont au cœur des enjeux de santé publique pour l'amélioration de la vie des hommes dans le monde, le respect de l'environnement et le développement d'un modèle économique et industriel viable.

En France, au moyen âge, les déchets domestiques étaient directement jetés à la rue. Les maladies et épidémies étaient légions. A partir du XIX^{ème} siècle, la construction d'égouts facilite le rejet des eaux usées à l'extérieure des villes³. Les lieux de rejets tels que les champs et les fleuves deviennent alors des zones très polluées. Les techniques évoluent alors jusqu'aux stations d'épurations actuelles.

Aujourd'hui, la situation est très disparate sur l'ensemble du globe. De nombreux pays, notamment africains, n'ont pas d'accès à une eau propre à la consommation (figure 1.1).



³ Site Web : Le Monde http://www.lemonde.fr/planete/article/2010/07/29/l-acces-a-l-eau-potable-devient-un-droit-de-l-homme_1393627_3244.html Mis à jour le 29.07.10

Figure 1.1 : Carte de la répartition des sources d'approvisionnement en eau potable en % de la population mondiale (en 2004)

Le mercredi 28 juillet 2010, l'assemblée générale de l'ONU a reconnu l'accès à une eau de qualité et à des installations sanitaires comme un droit humain⁴. Le rapport de l'ONU pointe le fait que 884 millions de personnes dans le monde n'ont pas accès à une eau potable de qualité et que plus de 2,6 milliards ne disposent pas d'installations sanitaires de base. Elle souligne qu'environ deux millions de personnes, pour la plupart des jeunes enfants, meurent chaque année des suites de maladies causées par une eau impropre à la consommation et l'absence de sanitaires.

Dans nos sociétés développées économiquement, les problèmes environnementaux deviennent de plus en plus préoccupants. Les sources de pollutions sont nombreuses. Les rejets des industries chimiques sont sources de pollutions de l'air, des sols, et de l'eau. L'agriculture intensive et l'utilisation massive d'engrais chimiques et de pesticides polluent les rivières en nitrates et autres composés chimiques très toxiques. Les élevages de bétails en masse induisent de forts risques de contaminations parasitaires des nappes phréatiques. Les parasites contenus dans les fèces des animaux diffusent et s'infiltrent dans les sous-sols lors de fortes pluies.

Des épidémies à grandes échelles d'origine hydrique ont été recensées lors des dernières décennies dans des pays développés, malgré l'existence de stations d'épurations modernes. Les épidémies d'origine hydrique qui font le plus de victimes sont dues à des bactéries comme *Vibrio cholerae*, responsable du Cholera. De nombreuses épidémies sont également liées à des protozoaires parasites tels que *Cryptosporidium spp.*. L'exemple le plus important est l'épidémie de Milwaukee au cours du printemps 1993 où plus de 400 000 personnes ont été infectées par *Cryptosporidium sp.*, parasite cause de la cryptosporidiose [Mac Kenzie et al., 1994]. 4 400 personnes ont été hospitalisées, 69 tuées.

⁴ Site Web : Le Monde http://www.lemonde.fr/planete/article/2010/07/29/l-acces-a-l-eau-potable-devient-un-droit-de-l-homme_1393627_3244.html Mis à jour le 29.07.10

Ce chapitre a pour objectif de faire un état des lieux non-exhaustif de la problématique de la gestion de l'eau et des moyens techniques employés pour son contrôle, puis de présenter les nouvelles méthodes basées sur l'emploi de laboratoires sur puce. L'intérêt de ces nouveaux outils microfluidiques est discuté.

Dans un deuxième temps, la réflexion se porte plus précisément sur le parasite responsable de la cryptosporidiose, maladie intestinale grave transmissible à l'homme causée par *Cryptosporidium spp.*. Les enjeux liés au contrôle de ce parasite sont expliqués. Certaines méthodes classiques et innovantes de détection sont présentées.

Pour chaque section, l'argumentation débute par la présentation d'outils de type capteur, puis s'enchaîne par l'exposé de dispositifs de détection et de contrôle de type biocapteur.

Enfin, la discussion se dirige vers la proposition d'un nouvel outil miniaturisé, capable de mesurer le pouvoir infectieux d'agents pathogènes.

1.2 L'environnement et l'eau

L'ère que nous traversons est marquée par l'innovation et le progrès scientifique et technique. Paradoxalement, l'humanité se trouve maintenant face à des choix stratégiques et politiques majeurs pour la gestion de son environnement, notamment au niveau de la ressource en eau. Cette orientation, basée sur le progrès technologique ne devra pas pour autant se faire dans le seul but de profiter à une minorité aisée de personnes vivant sur la planète. Les enjeux à venir liés à l'augmentation de la population et la raréfaction de la ressource en eau douce soulèvent donc, dès aujourd'hui, la question de l'accessibilité à l'eau pour tous et des moyens techniques mis en œuvre pour y parvenir.

L'accès à une eau propre à la consommation et à l'hygiène sanitaire n'est pas évident pour une large partie des habitants de la planète (1.6 milliards de personnes manquent d'eau potable), et il est annoncé que ce problème va s'aggraver avec la diminution des réserves en eau [Shannon et al., 2008].

Il faut toutefois noter que la problématique de l'eau n'est pas qu'une problématique des pays les plus pauvres. Ainsi, le centre de contrôle des maladies aux Etats-Unis (CDC, Atlanta) a recensé 780 épidémies d'origine hydrique entre 1971 et 2006 touchant près de 577 000 personnes. De même en Europe, il a été dénombré par exemple 413 épidémies d'origine hydrique entre 1999 et 2006 touchant près de 23 000 personnes [Figueras & Borrego, 2010].

Il apparait donc clairement qu'aux risques de pénuries s'ajoutent les risques sanitaires engendrés par la pollution de l'environnement et des réserves en eau.

L'émergence de nouvelles technologies a fait apparaître de nouvelles pollutions ; en 2002, l'agence U.S. Geological Survey a publié une étude reconnaissant l'occurrence de contaminants d'origine pharmaceutiques, hormonaux et organiques présents dans les ressources en eau des Etats Unis d'Amérique [Kolpin et al., 2002]. L'étude a fait remarquer que les doses détectées étaient généralement en deçà des seuils admissibles. Il existe toutefois un doute sur le risque estimé au niveau de la santé humaine du fait de l'absence de connaissance des effets de ces composés chimiques (agissant seul ou en synergie) sur le

métabolisme général. Associé à ce risque chimique, l'eau présente également un risque de contamination microbiologique.

Il est à noter que l'émergence de nouvelles technologies a également conduit à une meilleure analyse de l'eau tant au niveau chimique que microbiologique. L'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau de boisson s'est ainsi améliorée en même temps que l'émergence de nouvelles technologies. L'objectif premier de ces analyses demeure la protection des consommateurs contre des maladies dues à la consommation d'eau contenant des agents pathogènes de nature fongique, bactérienne, virale ou des protozoaires parasites. Depuis le siècle dernier, cette évaluation qualitative s'est notamment orientée vers la recherche d'indicateurs de pollutions fécales qui sont prédictives de la présence d'organismes potentiellement pathogènes dans l'eau.

Les progrès technologiques visant à améliorer les techniques d'analyse de l'eau ne sont donc pas achevés. Devant cet état de fait, le développement de nouveaux outils de détection grâce à la recherche est essentiel afin d'apporter des réponses ciblées et efficaces aux enjeux de ce nouveau siècle.

1.2.1 Management de l'eau : contrôler pour mieux gérer

L'eau est une ressource précieuse qui exige une gestion intelligente pour répondre aux besoins des populations mais aussi des industries et autres activités comme l'agriculture. La composition et la qualité d'une eau sont liées à l'environnement et sont donc très variées. En France, la qualité des eaux destinées à la consommation humaine est réglementée par décret⁵. Par exemple, pour les eaux brutes utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, une eau contenant plus de 20 000 *Escherichia coli* et plus de 10 000 entérocoques par 100 millilitres d'eau prélevée est impropre aux traitements. Selon le critère bactériologique, une eau est potable si elle ne contient aucun agent pathogène.

⁵ Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles

Dans les sociétés les plus riches, l'eau est traitée par des stations d'épuration qui la filtrent et l'assainissent par divers moyens physico-chimiques et biologiques. VEOLIA est le leader mondial dans le domaine.

Les eaux rejetées par les différentes activités humaines (domestiques, industrielles) posent un problème de gestion évident. En effet, les eaux usées contiennent divers éléments contaminants tels que les composés chimiques perturbateurs endocriniens (par exemple : le bisphénol A), les métaux lourds et les agents biologiques pathogènes. Que ces eaux soient rejetées dans l'environnement ou qu'elles soient réutilisées, il est souvent nécessaire de les retraiter afin d'en limiter l'impact environnemental.

Les effets de certains de ces polluants sur la santé humaine et les options pour s'en débarrasser ont été résumés par Bolong et ses collègues [Bolong et al., 2009]. Cependant, les moyens à mettre en œuvre pour le traitement des eaux usées peut, dans certains cas, être encore plus dévastateur, notamment lors de la réutilisation d'eau pour l'agriculture [Hamilton et al., 2006]. Il existe des risques de pollution et de salinisation des eaux souterraines et de surfaces, de dégradation de la qualité des sols avec un impact sur la croissance des cultures, de maladies et d'épidémies *via* la consommation de légumes arrosées avec des eaux usagées, et enfin la possibilité d'augmenter la production de gaz à effet de serre par l'emploi de procédés de traitement très coûteux en énergie, comme l'osmose inverse pour la désalinisation.

Ce constat démontre l'importance du contrôle des eaux, à chaque étape de son traitement avant consommation et utilisation. Il est également primordial de pouvoir analyser l'eau après qu'elle ait été traitée, notamment lors d'évènements épidémiologiques. Dans ce cas, la détection et l'identification de la source infectieuse d'agents infectieux permettent de solutionner le problème de manière plus efficace.

1.2.2 Quelques méthodes de détection « classiques »

Dans les stations d'épurations, il existe de nombreux capteurs en ligne pour la mesure du taux d'oxygène dissout, du pH, de la conductivité ou encore du niveau de surface et du débit. Pour les industries de procédés, dont le besoin en outils de contrôle est important, il existe des solutions d'instrumentations automatisées pour la mesure de paramètres physico-chimiques (pH, conductivité, potentiel d'oxydo-réduction), de la dureté, de nutriments (nitrates, phosphates), de CO₂ et d'O₂ dissout, de chlore. Les techniques de détection reposent sur la voltammétrie, l'ampérométrie (via des électrodes électrochimiques) et la colorimétrie. Agilent et Endress+Hauser sont des approvisionneurs mondiaux de ce type de systèmes. Eureka Environmental, Advance Measurements and Controls Inc, Horiba, Hach Co, ou encore In-Situ Inc sont d'autres fabricants de solutions d'analyses de la qualité de l'eau sur site (systèmes portables). Cependant, pour l'analyse fine de composés chimiques particuliers comme les micropolluants émergents, ou la détection de microorganismes, il est nécessaire d'effectuer des prélèvements d'échantillons qui sont ensuite envoyés en laboratoire.

Il existe des systèmes amont d'alertes de perturbations de la qualité de l'eau reposant sur la surveillance d'entités biologiques. Ces bio-systèmes permettent de réduire le nombre de prélèvements et d'analyses (généralement coûteux en temps et en ressources). Par exemple, un système automatisé détecte en temps réel les mouvements des branchies d'un poisson en aquarium où l'eau à surveiller s'écoule continuellement. Une alarme se déclenche lorsque des troubles sont mesurés [Shedd et al., 2001]. Ce type de protocole est très sensible et améliore la rapidité des actions à prendre lorsque des conditions toxiques sont avérées. Biological Monitoring Inc développe et commercialise ce système.

Aussi, l'apport des données satellites hydrologiques est essentiel pour l'amélioration de l'évaluation de la qualité de l'eau et l'optimisation de son utilisation, grâce à l'observation en continu des changements des phénomènes climatiques [Glasgow et al., 2004]. Le potentiel de cette approche a été couronné de succès lors de la prédiction d'épidémies infectieuses telles que la dengue, la fièvre jaune ou la malaria [(WHO), 2007, Rogers et al., 2002]. Ceci ne s'applique pas à des agents pathogènes de l'eau, mais l'approche est originale.

1.2.2.1 Les micropolluants non-vivants

La détection de micropolluants non-vivants dans l'eau (substances pharmaceutiques, hormones, métaux, pesticides, composés organiques) a fait l'objet d'un programme spécifiquement dédié nommé AMPERES, conduit par le Cemagref et Suez Environnement⁶. A partir de 21 stations d'épuration, plus de 2 000 échantillons ont été prélevés et plus de 5 000 analyses effectuées. Cette étude a permis de valider de nouveaux protocoles de prélèvement et d'analyses spécifiques à ces composés. La détection est basée sur les techniques de chromatographie en phase gazeuse ou liquide et d'électrophorèse capillaire qui peuvent être couplées à de la spectrométrie de masse [Miège et al., 2009]. Ces méthodes offrent une excellente sélectivité, sensibilité et reproductibilité. Cependant elles nécessitent du matériel coûteux ainsi que du personnel très qualifié.

La qualité de ce type d'analyse repose sur une préparation optimale de l'échantillon. Généralement, elle se fait par extraction sur phase solide. L'échantillon est filtré et concentré au travers d'une cartouche poreuse possédant une affinité importante avec l'analyte à étudier. Les problèmes de contaminations liées à la manipulation de matrices complexes, et les temps longs de préparation sont une limite majeure dans le domaine. Ils peuvent être contournés par l'automatisation des étapes de préparations et d'analyses, et la réduction des volumes employés [Rodriguez-Mozaz et al., 2007].

Certains types de capteurs emploient des entités biologiques comme éléments de reconnaissance d'espèces chimiques. Ces biocapteurs utilisent soit des éléments moléculaires tels que des anticorps, des enzymes, des récepteurs, de l'ADN ou des cellules entières (des bactéries par exemple) pour recueillir l'information. Par exemple, la mesure de CO₂ produit par la respiration microbienne est utilisée pour la quantification de la pollution organique (glucose dans l'étude) [Chiappini et al., 2010]. Récemment, un biocapteur capable de détecter des ions Cr⁶⁺ (chrome hexavalent) a été développé [Oh et al., 2011]. Son principe repose sur

⁶ Site web : <https://projetamperes.cemagref.fr/> date de dernière mise à jour : Juin 2011

la mesure des changements de pH et de conductivité électrique liés à l'inhibition de l'activité d'une bactérie oxydant le soufre en présence d'ions métalliques (cf. figure 1.2).

La sensibilité de ce prototype est de 5 ppb, les auteurs affirmant qu'elle est la plus basse des méthodes existantes.

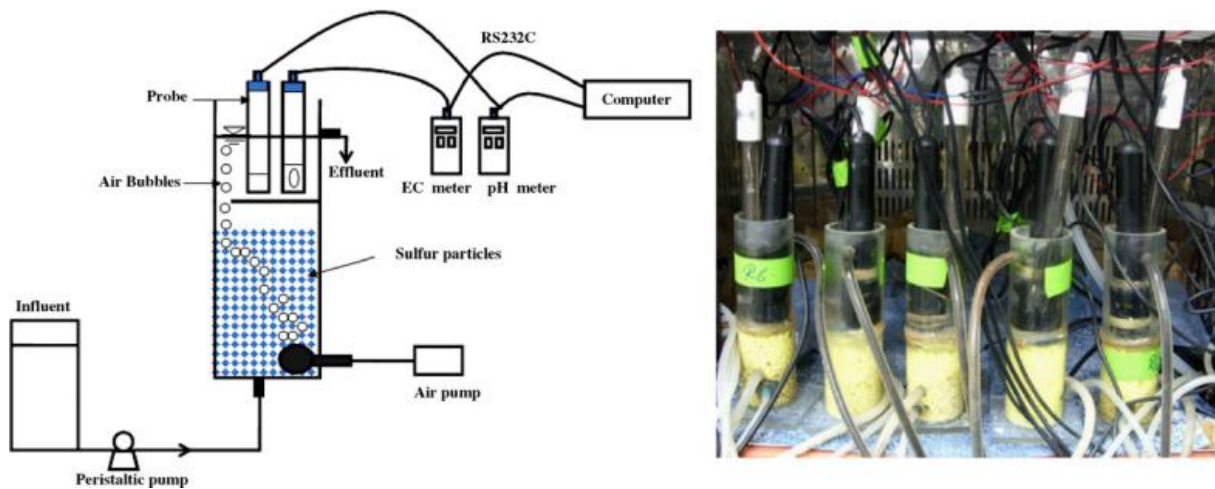


Figure 1.2 : (1) Diagramme schématique et (2) prototype du système de mesure de toxicité utilisant des bactéries oxydant le soufre [Oh et al., 2011].

1.2.2.2 Les microorganismes

La détection et l'élimination de microorganismes pathogènes dans l'eau (mais aussi dans la nourriture) est un défi ainsi qu'un problème de santé publique. C'est un défi car il n'existe pas à ce jour de méthode universelle capable de détecter tous les agents pathogènes d'intérêt [Straub & Chandler, 2003]. La difficulté réside dans les différences morphologiques et biologiques des divers groupes de pathogènes (virus, bactéries et protozoaires), et dans la difficulté de concentrer de larges volumes d'échantillons pour détecter de faibles quantités de certains d'entre eux. De plus, il existe d'autres sources d'augmentation du risque sanitaire, telle que la présence de toxines thermostables produites par exemple par certaines microalgues [Gassara et al., 2012].

Les premières investigations de la population microbiennes des eaux usées reposèrent sur l'observation microscopique et la culture en boîtes de Pétri [Gilbride et al., 2006]. L'unique observation ne permet pas de distinguer différentes populations de microbes, alors que la culture n'apporte pas d'informations détaillées de la composition de la communauté microbienne, sauf si elle est employée avec des milieux de cultures sélectifs, différenciant les espèces ou familles de bactéries. Les techniques d'isolation ont permis d'améliorer l'identification d'agents pathogènes par culture *in vitro*. Cependant, cette technique est également limitée par le fait que certains agents ne peuvent être cultivés en laboratoire.

Actuellement, l'analyse microbiologique de l'eau, réalisée en routine, vise à évaluer la présence de microorganismes indicateurs, tels que les coliformes (exemple : bactérie *E. coli*), afin de prédire le niveau de contamination fécale. Selon la réglementation, l'eau distribuée ne doit contenir aucune bactérie de ce type dans 100mL d'eau. L'avantage de cette technique est qu'elle est simple à mettre en œuvre, et ne se focalise que sur un nombre limité de microorganismes. Cependant, cette méthode n'est pas infaillible, notamment après traitement de l'eau. L'épidémie parasitaire de Milwaukee en 1993 fut causée par la présence d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* dans l'eau alors que les seuils indicateurs basés sur la recherche de bactéries n'étaient pas atteints après traitement au chlore [Mac Kenzie et al., 1994].

Ces dix dernières années, l'émergence de techniques utilisant la spectrométrie de masse ou des approches moléculaires a permis d'examiner la diversité microbienne et de détecter des microorganismes spécifiques sans requérir à une mise en culture préalable [Gilbride et al., 2006]. Les techniques moléculaires regroupent les interactions antigènes-anticorps et l'approche biomoléculaire basée sur l'analyse des acides nucléiques. Plus particulièrement, depuis l'émergence de techniques biomoléculaires visant à amplifier de façon ciblée des fragments nucléiques par réaction en chaîne par polymérase (PCR), de nombreuses stratégies dérivées ont été développées. Sans être exhaustif, la PCR nichée (pour augmenter la sensibilité des détections), la PCR en transcription inverse (pour l'analyse de l'ARN) ou la PCR temps réel (pour accélérer le rendu des résultats) se sont implantées en routine dans les laboratoires d'analyses. Plus récemment enfin, des sondes fluorescentes pour l'hybridation in situ et des puces à ADN ont été développées [Gilbride et al., 2006, Bouzid et al., 2008] pour revue.

La technologie des puces à ADN est basée sur la capacité de deux brins d'ADN complémentaires à s'hybrider. Des milliers de sondes peuvent être déposées sur un substrat de quelques centimètres carrés. Ces outils sont capables de détecter simultanément de nombreux agents pathogènes présents dans l'eau de boisson [Zhou et al., 2011], ou dans la nourriture [Kostrzynska & Bachand, 2006]. Par contre, il existe de nombreux défis techniques à lever en vue de son application à des échantillons complexes [Gilbride et al., 2006, pour revue].

Comme le montre l'émergence des puces à ADN, les biocapteurs sont très adaptés à la détection de microorganismes. Par exemple, des bactériophages sont utilisés pour le contrôle et la détection de bactéries dans la nourriture [Hagens & Loessner, 2007], pour revue]. La détection est très sélective car certains bactériophages sont très spécifiques de l'hôte. Ainsi, le marquage fluorescent de bactériophages spécifiques de *Salmonella typhimurium* a permis la détection de *Salmonella* parmi d'autres espèces de bactéries [Mosier-Boss et al., 2003]. Lorsque plusieurs bactériophages marqués infectent la bactérie, cette dernière est visible par microscopie à épifluorescence. Le couplage de l'emploi de bactériophages à des quantum dots (nanocristaux fluorescents) augmente la sensibilité à 10 bactéries par millilitre [Edgar et al., 2006]. La compagnie LUMINULTRA est un vendeur commercial de solutions d'analyse en kits de la présence de microorganismes actifs (vivants) basées sur la détection par luminescence de molécules d'ATP. Une technique de détection par colorimétrie de parasites du genre *Giardia*, basée sur les interactions immunologiques, a été améliorée grâce à l'emploi et la croissance de nanocristaux d'or pour amplifier le signal lumineux [Li et al., 2009].

1.2.2.3 Conclusion partielle

La première étape nécessaire à une gestion efficace et optimale des eaux de surfaces et souterraines est le contrôle continu de la qualité de l'eau par la caractérisation de la présence, de la distribution et de l'origine des contaminants. Ceci met en lumière le besoin urgent d'outils de détection et de contrôle rapides et peu coûteux. L'accumulation des données de mesure est d'une importance cruciale pour une meilleure compréhension de l'impact des polluants sur les systèmes aquatiques. Dans l'idéal, ces analyses doivent être effectuées en temps réel sur différents lieux stratégiques du réseau à gérer (entrée et sortie des stations d'épurations, entrée et sortie des industries par exemple).

La détection de microorganismes pathogènes est difficile du fait de la complexité des échantillons. Pour l'analyse d'une bactérie comme *E. Coli O157*, la difficulté est de filtrer et d'isoler l'objet parmi de nombreux microorganismes non-ciblés [Quilliam et al., 2011, pour revue]. Les méthodes employant la culture et les agents indicateurs sont simples à mettre en œuvre mais coûteuses en temps (> 48h) et en ressources. Les méthodes moléculaires sont sensibles et sélectives mais la présence d'inhibiteurs peut biaiser le résultat de mesure. De plus ces techniques sont très onéreuses et exigent du personnel qualifié. Il est également à noter que le choix des amorces nucléotidiques, utilisées par exemple dans les stratégies d'analyses biomoléculaires, peut conduire dans certains cas à une caractérisation non spécifique à l'échelle générique (c'est-à-dire au niveau du genre). De plus ce type de technique peut mener à des problèmes d'amplification en situation de co-infestation par plusieurs agents biologiques d'espèces différentes.

Pour conclure, malgré l'existence d'outils de détection et de traitement toujours plus sophistiqués, le risque sanitaire est encore réel. Quilliam et al. ajoutent que l'augmentation de la production de bétails en masse risque de faire exploser l'occurrence d'agents pathogènes dans l'environnement [Quilliam et al., 2011]. Lakind et ses collègues rapportent que des microorganismes à risque pour la santé humaine sont présents dans les eaux de piscines, et que les traitements de désinfection tels que la chloration peuvent produire des bioproduits de désinfection dont les effets sur la santé sont peu connus [Lakind et al., 2010]. Pour répondre à

cette problématique, un système automatisé, temps réel, de mesure et de contrôle de la qualité de l'eau de piscine est en cours de développement et de test en Irlande⁷. Ce dispositif est capable de mesurer de nombreux paramètres en temps réel (température, chlore, potentiel redox, pH, turbidité, dureté, solides dissouts). Il intègre un biocapteur basé sur la technologie des puces à ADN pour le test de la présence de bactérie *E. Coli O157*. Les auteurs indiquent que la sonde peut être changée afin de détecter la présence d'autres agents pathogènes tels que *Cryptosporidium sp.* Ce type de dispositif automatisé, multi-paramètres, s'insère dans la philosophie des nouveaux systèmes alternatifs en cours de développement : les laboratoires sur puces.

⁷ Site web : <http://arrow.dit.ie/engschmanconn/17>

1.3 La microfluidique et les Lab-On-Chip : applications dans le domaine de l'eau

La microfluidique est une science récente ayant émergé au début des années 1990 avec la réalisation de microsystèmes de chromatographie et le développement de structures spécialement dédiées comme les micro-valves et les micro-pompes [Yeo et al., 2011]. Une plateforme microfluidique apporte une série d'opérations fluidiques par la combinaison d'éléments fabriqués par les techniques de micro-technologies. La plateforme microfluidique est l'outil de demain pour la miniaturisation, l'intégration, l'automatisation et la parallélisation de procédés biochimiques [Mark et al., 2010]. Le laboratoire sur puce est l'outil microfluidique par excellence. Il a pour finalité de rassembler toutes les étapes d'analyse d'un laboratoire classique sur une même puce.

Mark et al. présentent dans leur revue les diverses technologies de laboratoires sur puce (capillaire, continue en flux laminaire, continue en goutte, déplacement de liquide par centrifugation, électromouillage) et les marchés potentiels que ces plateformes peuvent directement percer (biotechnologies, écologie, diagnostic *in vitro*, pharmaceutique) [Mark et al., 2010, pour revue]. La portabilité, le haut débit d'analyse, la réduction des coûts en instruments et consommables, l'analyse multiparamétrique, la faible consommation en réactifs, la diversité des fonctions et opérations possibles, la précision/sensibilité, et la souplesse de programmation sont les nombreux critères auxquels un laboratoire sur puce doit répondre. Ces nombreux défis font que la technologie microfluidique n'est pas encore très développée commercialement.

De nombreux prototypes existent pour diverses applications dans le domaine de l'agroalimentaire, de l'agriculture et des industries de biosystèmes [Neethirajan et al., 2011] pour revue]. L'apport de la microfluidique est potentiellement considérable même si de nombreuses barrières subsistent (notamment au niveau de la préparation de l'échantillon). Malgré tout, quelques fabricants commercialisent des systèmes microfluidiques d'analyse et de contrôle (Affymetrix Inc, Agilent Technologies Inc, Epigem, Nanoterra).

Dans le domaine du contrôle de la qualité de l'eau, le besoin d'outils miniaturisés est de plus en plus grand. Du fait de l'encombrement des systèmes généralement utilisés, les mesures sur site sont actuellement difficiles. De même, l'analyse locale de milieux particuliers de faibles volumes tels que les biofilms (largement présents dans les stations d'épurations) et les sols ne sont pas possibles avec ce type d'outils [Jang et al., 2011].

Il existe de multiples méthodes pour la détection et l'analyse de paramètres physiques. Ces méthodes reposent sur la mesure d'une perturbation d'un phénomène à l'aide d'une sonde. Cette sonde peut être optique, électrique, magnétique, mécanique, acoustique ou biologique. Les laboratoires sur puces développés de par le monde intègrent des variétés considérables de sondes à l'aide des technologies de miniaturisation [Mark et al., 2010]. Seuls certains d'entre eux seront présentés dans cette section.

1.3.1 Détection de micropolluants inorganiques

Certaines analyses actuellement utilisées sont lourdes à mettre en œuvre. Il en existe de très pratiques, tels que les tests colorimétriques portatifs pour la détection de phosphate⁸. Ce type de test nécessite tout de même quelques opérations manuelles (mélanges de réactifs). De ce fait, il est difficile d'obtenir des informations en continu dans le temps et en diverses localisations sans déployer beaucoup de moyens [Cleary et al., 2008]. Dans le but d'obtenir un contrôle accru des eaux de rivières et de lacs, un laboratoire sur puce a été fabriqué et implanté dans un prototype portable (cf. figure 1.3) [Slater et al., 2010]. Les performances sont semblables à un système commercial couramment utilisé (contrôleur de Phosphate Aztec P100, limite de détection : 0.1mg de phosphore par litre). Cependant, l'analyseur n'offre pas de bons résultats lorsque l'échantillon est riche en particules solides.

⁸ Forme commune du phosphore servant de nutriment de base à de nombreuses formes végétales et algales. Cette composante chimique est un des facteurs responsables de l'eutrophisation des milieux aquatiques.



Figure 1.3 : (Gauche) Vue de l'analyseur montrant l'emplacement du laboratoire sur puce microfluidique (1), le panneau de contrôle (2), un modem GSM (3). (À droite) Vue de la pompe (4), la batterie et les stockages de produits chimiques (5) [Slater et al., 2010].

Un autre polluant important est le nitrate. Les systèmes commerciaux disponibles utilisent des volumes de réactifs de l'ordre du millilitre (mL) par analyse, ce qui est excessif pour des objectifs de mises en réseaux d'appareils de mesure (par exemple, pour le contrôle de la quantité de micropolluants dans les océans) [Beaton et al., 2011]. Un système microfluidique de détection colorimétrique pour la détermination de la concentration de nitrate apporte de réelles réponses aux problèmes de volumes de réactifs et de consommation de puissance électrique (cf. figure 1.4).

L'intégration facile de microélectrodes dans les laboratoires sur puce ouvre de nombreuses perspectives dans la miniaturisation de capteurs électrochimiques. Ainsi, Jung et al. ont présenté récemment un laboratoire sur puce composé d'une électrode en argent réutilisable et de micro-canaux, pour la mesure continue, et sur site, de métaux lourds (du plomb dans l'étude) [Jung et al., 2011]. Ce système est capable de mesurer des concentrations de plomb variant de 1 à 1 000 ppb, avec une reproductibilité importante pour ce type d'outils (plus de 40 analyses consécutives). De plus, il ne génère pas de produits toxiques et n'emploie pas

d'électrodes de mercure, contrairement aux systèmes à base d'électrodes généralement utilisés.

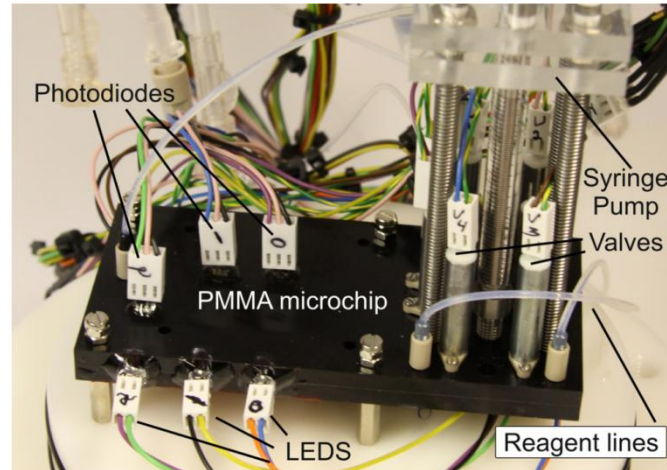


Figure 1.4 : Photographie du système microfluidique autonome de détection de nitrate, un appareil fabriqué avec PMMA (poly-(methylnmethacrylate)) teinté [Beaton et al., 2011].

Les biocapteurs sont étroitement liés au développement des laboratoires sur puce. Les techniques actuelles permettent de disposer ces sondes (ADN, ARN, antigènes, protéines, aptamères qui sont des oligonucléotides synthétiques, bactéries, cellules) à l'échelle micrométrique voire nanométrique. Les biocapteurs offrent la possibilité de mesurer la toxicité et les effets de perturbateurs endocriniens de polluants [Rodriguez-Mozaz et al., 2007]. De plus, ils apportent une haute sélectivité pour la détection d'éléments au sein de milieux complexes. Divers prototypes existent pour la détection de plomb [Chang et al., 2005], d'arsenic [Theytaz et al., 2009], de produits phytosanitaires et cyanotoxines [Long et al., 2008], ou encore d'agents toxiques comme les styrènes [Ratanachoo et al., 2002] ou le bisphénol A [Jo et al., 2011].

1.3.2 Détection d'agents pathogènes

1.3.2.1 Préambule

L'émergence de problèmes liés au diagnostic et au contrôle d'agents pathogènes présents naturellement dans les aliments, dans l'eau ou de façon plus générale dans notre environnement fait ressortir le besoin de détecter et d'identifier rapidement les micro-organismes pouvant être dangereux. Cette nécessité peut d'ailleurs représenter un enjeu stratégique au niveau des nations lorsque les agents infectieux sont employés à des fins militaires ou terroristes [Meltzer et al., 2011].

Pour exemple, dans le cadre d'une pollution biologique de l'environnement, la prolifération d'algues microscopiques capables d'induire des toxi-infections alimentaires a été très largement étudiée, et fait l'objet tous les ans d'une importante médiatisation dans les journaux lors d'interdictions préfectorales de vente de produits conchylicoles. Le phytoplancton microscopique incriminé comprend des algues unicellulaires (protozoaires, eucaryotes) produisant des toxines (Toxines diarrhéiques pour *Dynophysis spp*, toxines paralysantes pour *Alexandrium minutum*, et des toxines amnésiantes pour des organismes du genre *Pseudo-nitzschia*). Actuellement ces micro-organismes font l'objet d'une surveillance par le réseau REPHY de l'IFREMER. En effet, ces micro-algues, lorsqu'elles sont présentes en trop grande quantité dans l'eau de mer, peuvent s'accumuler dans les fruits de mer (huîtres, moules) et rendre leur consommation impropre pour la santé humaine. Par conséquent, la détection précoce de ces épisodes de proliférations algales demeure une préoccupation importante. Dans ce contexte, il faut non seulement détecter mais surtout classifier les diverses espèces d'algues en présence de manière rapide. Pour répondre à cet objectif, un système optofluidique capable de détecter et de distinguer différentes espèces d'algues procaryotes a été créé. En employant un guide d'onde illuminant une petite portion d'un micro-canal et un photo-détecteur, une relation entre l'ondelette générée par l'interaction algue/lumière et la forme géométrique de l'algue a été mise en évidence [Schaap et al., 2011].

Le développement de μ TAS (micro-Total Analysis System) en tant que plateforme microfluidique complète est l'enjeu à venir pour le développement commercial des laboratoires sur puce [Mairhofer et al., 2009]. Lee et al. présentent dans leur travaux la préparation d'un échantillon d'ADN par lyse de l'agent pathogène à étudier, puis son amplification par PCR sur le même dispositif microfluidique [Lee et al., 2006]. Il existe aujourd'hui quelques compagnies spécialisées dans la création de plateformes microfluidiques (exemple : Micronics, Biacore, Labnow) pour le diagnostic de maladies et la détection d'interactions biomoléculaires.

Cependant, la discipline est à ses premiers stades de développement et de nombreux prototypes de laboratoire sur puce dédiés à la détection d'agents pathogènes sont fabriqués et étudiés. La détection peut se faire de manière optique [Schulze et al., 2009], mécanique à l'aide de micro-poutres (cantilever) [Waggoner & Craighead, 2007], magnétique et électrique. La bio-détection est une voie largement explorée [Velusamy et al., 2010], basée sur l'interaction entre un élément de reconnaissance et un élément cible au niveau de la bio-interface (interaction ligand/récepteur) [Leonard et al., 2003]. Les biocapteurs basés sur l'ADN [Dutse & Yusof, 2011] sont très développés. Il existe aussi de nouvelles perspectives grâce à l'utilisation de nanomatériaux (exemple : les 'quantum dots') [Vikesland & Wigginton, 2010]. Lee et al. ont identifié le potentiel de systèmes micro/nano-fluidiques pour le diagnostic de maladies infectieuses tels que la malaria, la tuberculose et le VIH, dans les pays dont les ressources sont très limitées [Lee et al., 2010]. En effet, les systèmes microfluidiques miniatures sont capables de réduire le temps d'analyse d'un diagnostic microbien d'au moins une décade, et les volumes d'échantillons et de réactifs d'au moins deux décades [Liu & Zhu, 2005].

1.3.2.2 Quelques exemples

Les microorganismes pathogènes qui vont nous intéresser dans la suite de ce travail sont : les virus, les bactéries et les protozoaires.

Li et al. ont réduit les temps d'amplification et de détection de rotavirus (généralement présents dans les excréments) à une heure (durée de l'analyse : 1 minute) en intégrant la technique de PCR dans un système microfluidique et en employant une détection en ligne par fluorescence [Li et al., 2011]. La technique d'emprunte moléculaire sur polymère pour la liaison spécifique de virus, couplée à la spectroscopie d'impédance, a permis de détecter des virus dans un système microfluidique en flux. Cette analyse a pu être réalisée de manière répétée grâce à la possibilité de nettoyer les sites de capture en augmentant la vitesse du fluide [Birnbaumer et al., 2009].

La bactérie la plus utilisée comme modèle est *Escherichia coli* (*E. coli*) car elle fait partie des indicateurs de présence d'agents pathogènes d'origine fécale. Des laboratoires sur puce dédiés à sa détection emploient des méthodes de caractérisation électrique par signature diélectrophorétique [Chow & Du, 2011], ou mécanique comme la microbalance à quartz [Sun et al., 2009]. Lagally et al. ont développé un microsystème portable d'analyse génomique de *E. coli* et de *Staphylococcus*, grâce à la PCR et à l'électrophorèse capillaire [Lagally et al., 2004]. L'amplification par PCR de 4 bactéries différentes a été démontrée sur une même puce de microfluidique capillaire [Ramalingam et al., 2010]. Han et al. ont fabriqué un système de comptage optique de cellule unique de *E. coli*, basée sur l'immunoagglutination de billes de latex fonctionnalisées [Han et al., 2008]. Le principe d'immunoagglutination a été employé pour la détection de présence de *E. coli* à partir d'échantillons directement prélevés dans des fontaines, des toilettes et des étangs [Kwon et al., 2010].

Leskinen et al. ont intégré un biocapteur microfluidique d'analyse immunologique à une chaîne de prélèvement et d'ultrafiltration d'échantillons de 100 litres d'eau de mer sur une période de 9 mois [Leskinen & Lim, 2008]. Ils ont ainsi réduit le temps d'analyse de bactéries du genre *Enterococcus* à 2h30 au lieu de 24h. Des nanomatériaux tels que des nanotubes de carbone peuvent être fonctionnalisés par l'antigène d'intérêt pour l'analyse immunologique.

Ainsi, un lab-on-chip de ce type a été développé pour la détection de l'entérotoxine B staphylococcique produite par *Staphylococcus* avec une sensibilité de 0.1 ng/mL [Yang et al., 2010].

Les protozoaires font également l'objet de développement de systèmes de détection miniaturisés. Dalton et al. ont déterminé la viabilité de parasites du genre *Cryptosporidium* grâce à la technique d'électrorotation : sous l'influence d'un champ électrique tournant, le parasite tourne sur lui-même à une vitesse dépendante de ses propriétés diélectriques [Dalton et al., 2001]. Grow et al. ont fabriqué une bio-puce composée d'une surface métallique active sur laquelle des biomolécules de capture ont été greffées chimiquement [Grow et al., 2003]. Lorsqu'un objet est immobilisé sur une surface active, il est possible d'obtenir par microscopie Raman une empreinte spécifique de l'objet liée à son interaction avec une onde lumineuse (Surface enhanced Raman Spectroscopy). Dans le système développé par Grow et ses collègues, chaque micro-dépôt de biomolécules (équivalent à un pixel) est excité par un laser afin de générer la diffraction Raman. Le spectre résultant est capté par le microscope Raman et est comparé à une base de données d'empreintes. Avec ce système, il est possible d'analyser un échantillon complexe de microorganismes (bactéries et protozoaires) et de toxines sur une seule puce, à l'aide d'un seul microscope. La grande sélectivité du système permet de déterminer l'état physiologique des bactéries capturées, de distinguer les organismes viables et non viables, et de détecter et identifier les toxines produites par des agents pathogènes.

1.4 *Cryptosporidium sp.* : Problématique et outils

1.4.1 *Cryptosporidium sp.* : Un problème de santé publique

Les maladies diarrhéiques sont responsables de la mort de plus de 1.5 millions d'enfants de moins de 5 ans par an [Cabral et al., 2009]. *Cryptosporidium sp.* se transmet à travers le monde, les enfants étant les plus touchés [Putignani & Menichella, 2010]. Il représente de ce fait un problème de santé publique majeur dans les pays en voie de développement [Snelling et al., 2007], notamment à cause de sa virulence sur les personnes atteintes par le développement d'un SIDA [Tumwine et al., 2005]. Dans les pays développés économiquement, il est également source de préoccupation : sur 325 épidémies hydriques d'origine parasitaire dans les pays développés, *Cryptosporidium sp.* est mis en cause dans plus de 50% des cas [Karanis et al., 2007].

Cryptosporidium spp est un genre de protozoaire regroupant plus d'une vingtaine d'espèces [Fayer, 2010]. Il a été découvert par Tyzzer il y a un siècle, mais son implication dans des maladies gastro-intestinales n'a été formellement reconnue qu'au début des années 1980 [Tzipori & Widmer, 2008].

Sur les 23 espèces actuellement décrites au sein du genre *Cryptosporidium*, 10 espèces ont été caractérisées chez l'homme [Chalmers & Giles, 2010]. Certaines espèces sont mêmes propres à l'homme telle que *C. hominis*. D'autres peuvent être retrouvées à la fois chez l'homme et chez les animaux d'élevage comme *C. parvum* [Fayer, 2004]. De ce fait, l'exploitation intensive du cheptel animal, les risques d'infection ne sont pas négligeables malgré le traitement de l'eau par des stations d'épuration évoluées (exemple de l'épidémie de Milwaukee en 1993 [Mac Kenzie et al., 1994]). *C. parvum* et *C. Hominis* sont responsables de plus de 90% des infections chez l'homme [Xiao & Ryan, 2004].

La cryptosporidiose, maladie consécutive à l'infestation par des *Cryptosporidies*, se caractérise le plus souvent par des diarrhées aiguës mais auto résolutes chez des patients immunocompétents [O'Hara & Chen, 2011]. Ces pertes hydriques et électrolytiques peuvent cependant devenir chroniques chez les personnes immunodéprimées [Tumwine et al., 2005] et engager leur pronostic vital. Cette maladie peut toucher également le bétail, notamment les animaux nouveaux nés, et provoquer de lourdes pertes économiques [de Graaf et al., 1999].

Il a été observé récemment dans une étude en Espagne, que des salades arrosées avec de l'eau contaminée pouvaient posséder des traces de parasites [Alonso & Cuesta, 2010]. Par conséquent, les risques d'infection par la consommation d'aliment ne sont pas négligeables.

Toutefois, il ressort que les voies de transmissions majeures sont l'eau de boisson, les eaux récréatives, les contacts entre individus contaminés et l'ingestion d'aliments souillés [Morgan & Thompson, 1998].

Cryptosporidium spp. est un parasite intracellulaire mais extracytoplasmique qui s'attaque aux microvillosités des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Des localisations pulmonaires ont été décrites chez des patients sidéens et dans des cryptosporidioses aviaires. Le cycle du parasite commence suite à l'ingestion de la forme de résistance du parasite : l'oocyste. Ce dernier comprend 4 sporozoïtes qui s'attaquent après désenkystement aux cellules intestinales où ils forment au sein d'une vacuole parasitophore, un trophozoïte. Le trophozoïte évolue pour donner des mérontes de type 1 contenant 8 mérozoïtes qui peuvent donner après émission dans l'intestin de nouveaux mérontes de type 1 ou des mérontes de type 2. Ces derniers donnent en mûrissant 4 mérozoïtes qui, une fois libérés, permettent la formation d'un macro ou d'un micro gamonte. De ces structures sont produites des micro et des macro-gamètes qui, après fécondation, permettent la formation de nouveaux oocystes. Les oocystes à parois fines participent à un mécanisme d'auto-infestation tandis que les oocystes à parois épaisses sont libérés dans l'environnement via la matière fécale. Les propriétés de résistance des oocystes aux conditions environnementales permettent leur survie pendant des mois jusqu'à ce qu'ils soient ingérés par un nouvel hôte approprié. Dans le nouvel hôte, le cycle de développement parasitaire peut alors reprendre.

Le risque n'est pas seulement lié à l'eau. La consommation en masse d'aliments à risque comme la laitue (fortement utilisée, notamment dans les hamburgers) nécessite le développement de techniques d'isolation et de détection du parasite plus efficaces [Moore et al., 2007]. Les taux d'extraction du parasite varient de quelques % à 60% suivant l'échantillon étudié, ce qui exige l'optimisation des méthodes actuelles [Smith & Nichols, 2010]]. L'évaluation du risque sanitaire est une préoccupation impliquant l'utilisation de méthodes robustes et efficaces de détection [Slifko et al., 2000], ainsi que l'élaboration de modèles numériques de prédiction d'épidémies intégrant les données concernant le parasite [Cummins et al., 2010].

Enfin, à son stade infectieux, *Cryptosporidium sp.* est très résistant, notamment au traitement à base de chlore [Chauret et al., 2001]. Il est sous forme d'oocyste, sphéroïde de quelques micromètres de diamètre à la paroi très résistante. Or, lorsqu'il est infecté, un homme rejette plus de 10 millions d'oocystes par gramme d'excréments [Smith & Nichols, 2010]. A ce jour, il n'existe pas de traitement médicamenteux de la cryptosporidiose [Sunnotel et al., 2006]. Par conséquent, des progrès sont nécessaires, non seulement pour la détection et la surveillance du parasite [Bouzid et al., 2008] mais aussi pour l'identification de nouveaux médicaments et de nouvelles procédures de désinfection [Ortega-Pierres et al., 2009].

1.4.2 Les outils actuels de détection du parasite

Il existe une méthode réglementaire de détection de présence de *Cryptosporidium parvum* présent dans les eaux de surface destinées à la consommation [Slifko et al., 2000]. Cette procédure réglementaire est décrite par l'Agence de Protection Environnementale des USA (USEPA) par la méthode 1623 (mise à jour en 2005) [USEPA, 2005]. Elle est également réglementaire pour la détection du protozoaire *Giardia*. Après un prélèvement d'un échantillon de 10L suivant un protocole drastique de transport et de conservation, l'eau est filtrée sur cartouche puis les parasites sont concentrés par séparation immuno-magnétique. Les parasites sont collectés grâce à un aimant dans un volume de 10mL. Ensuite ils sont concentrés par centrifugation pour l'obtention d'un volume de 1,5mL. Les oocystes sont

séparés des billes magnétiques puis l'échantillon est marqué par immunofluorescence ou par coloration DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Enfin, les parasites sont comptés, soit automatiquement à l'aide d'un cytomètre en flux, soit manuellement sur une lame de comptage grâce à un microscope à fluorescence et à contraste interférentiel différentiel (méthode Nomarski).

Cette méthode est lourde à mettre en œuvre et ne permet qu'une simple détection de présence. Ni l'espèce du parasite, ni sa viabilité ou son pouvoir infectieux ne peuvent être appréhendés. Seules des personnes qualifiées sont capables d'effectuer ce test, ce qui participe à l'augmentation de son coût. De plus, il existe des risques de surestimation à cause d'interférences possibles entre les marqueurs fluorescents et d'autres organismes ou débris. Enfin du fait des concentrations naturellement faibles en oocystes (10 oocystes par litre), le taux de recouvrement de la méthode dépend fortement du lieu de prélèvement [DiGiorgio et al., 2002]. La technique de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) est très sélective car elle permet de distinguer différentes espèces de *Cryptosporidium*, mais ne donne aucune information sur le pouvoir infectieux.

Des outils innovants sont également développés pour la détection du parasite. Parmi eux, nous pouvons citer les travaux de Kang et al. qui utilisent les techniques optiques de Résonance de Plasmon de Surface (SPR), surface spécialement modifiée pour la détection de *C. parvum* [Kang et al., 2006]. La limite de détection reste élevée, en comparaison de la concentration naturelle d'oocystes, puisqu'elle est de 100 oocystes/mL (~ 0.1 oocyste/ μ L). Rule et al. utilisent des nanoparticules d'or pour la détection du parasite par spectroscopie Raman (Surface-Enhanced Raman spectroscopy) [Rule & Vikesland, 2009].

1.4.3 La viabilité et le pouvoir infectieux

Robertson propose une définition claire de la viabilité et du pouvoir infectieux. 'Viable' a été défini comme 'capable de se reproduire dans des conditions appropriées', mais les auteurs suggèrent que la viabilité pourrait être mieux utilisée pour indiquer l'activité métabolique ou l'intégrité de l'oocyste. Ainsi, un oocyste viable peut être infectieux ou non infectieux (ses sporozoïtes ne sont pas capables d'initier une infection), et s'il est non infectieux, cela est sans importance pour la santé publique [Robertson & Gjerde, 2007].

Neumann et al. ont investigué la viabilité et le pouvoir infectieux de *Cryptosporidium parvum* par la technique de désenkystement *in vitro* [Neumann et al., 2000a]. Le désenkystement est la libération des sporozoïtes contenus dans l'oocyste lorsque les conditions sont propices (notamment en milieu acide). Cette technique est largement utilisée comme indicateur de la viabilité de ces parasites. On a même considéré que les parasites n'ayant pas désenkysté étaient non viables. Lors du protocole de désenkystement (dont la durée a été augmentée à trois heures au lieu d'une), tous les oocystes n'avaient pas désenkysté. Il s'est avéré par des tests sur des souriceaux que ces oocystes étaient toujours infectieux. De ce fait, cette étude montre que le protocole de désenkystement n'est pas une méthode précise de mesure de la viabilité et du pouvoir infectieux de *Cryptosporidium parvum*.

Pour les techniques concernant l'évaluation de la viabilité, de nombreuses stratégies biomoléculaires basées sur la technique de RT-PCR (PCR après transcription inverse), ont été développées pour tester la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium parvum*. Ainsi, les travaux de Widmer [Widmer, 1998] ciblant l'ARNm Tubulin, ou ceux de Jenkins [Jenkins et al., 2000] amplifiant l'ARNm codant une amyloglucosidase sont deux exemples pionniers dans cette stratégie.

Il existe de nombreux outils de détection basés sur des méthodes moléculaires (basées sur les acides nucléiques ou les interactions immunologiques) [Jex et al., 2008]. La viabilité des oocystes peut être estimée grâce à l'amplification d'une séquence d'ADN spécifique (une région de 873 paires de bases parmi un fragment d'ADN de 2359 paires de bases codant pour une protéine répétée des oocystes de *C. parvum*) par PCR [Wagner-Wiening & Kimmig,

1995]. Ainsi, 100 sporozoïtes désenkystés ont été détectés après 30 cycles. Les résultats de cette expérimentation ont montré que le résultat de la PCR n'était positif qu'en présence de sporozoïtes viables. Divers contributions apportent des améliorations sur les protocoles d'isolation et de comptage du parasite par cytométrie en flux [Barbosa et al., 2008, Montemayor et al., 2007, Valdez et al., 1997]. Wang et al. emploient une détection électrochimique d'une séquence d'ADN de *Cryptosporidium parvum* [Wang et al., 1997].

La technique de coloration d'acides nucléiques (Nucleic Acid Staining) par certains composés moléculaires marquant l'ADN du parasite a été employée pour la mesure du pouvoir infectieux de *Cryptosporidium parvum* [Neumann et al., 2000b]. Un autre jeu de colorants, le DAPI et le PI (4',6-diamidino-2-phenylindole / Iodure de Propidium), est couramment utilisé pour l'évaluation de la viabilité uniquement.

La mesure du pouvoir infectieux est intéressante car elle améliore l'information fournie par les analyses classiques, qui jusqu'à présent se limitent à une réponse binaire de type présence ou absence. Or, il est évident que la présence d'agents qui ne sont plus infectieux ne représente pas le même risque que la présence d'agents encore infectieux. De plus, la simplification de la mesure du pouvoir infectieux et par voie de conséquence l'évaluation de sa perte ou de son maintien permettrait de valider de nouvelles procédures d'inactivation du parasite. Enfin, l'existence d'un test en routine du pouvoir infectieux en tant qu'outil de substitution du modèle animal autoriserait l'expérimentation de nombreuses molécules anti parasitaires dans le cadre de recherches de traitements médicaux ou de désinfectants. Cette approche serait un atout pour s'affranchir du modèle animal, éthiquement discutable, et pour diminuer le coût de l'analyse, demandant généralement l'emploi d'une main d'œuvre technique qualifiée.

La méthode standard la plus efficace de la mesure du pouvoir infectieux de *Cryptosporidium parvum* est l'infection de souriceaux nouveaux nés. Elle est couramment employée pour des études d'inactivation du parasite dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments. Elle n'est pas adaptée pour l'étude d'échantillons environnementaux car il est nécessaire d'inoculer des dizaines de parasites pour déclencher l'infection [Rochelle et al., 2002]. De plus, elle ne permet pas d'étudier toutes les espèces, notamment *C. hominis* qui infecte particulièrement l'homme mais pas la souris. Aussi, l'étude sur des hommes volontaires est

parfois effectuée pour la mesure de la dose minimale provoquant l'infection [DuPont et al., 1995]. Ces méthodes sont chères, coûteuses en temps et en techniciens qualifiés, et sont discutables d'un point de vue éthique.

Une alternative plus éthique et moins coûteuse est l'infection sur des cultures de cellules *in vitro* [Arrowood, 2002]. Une étude prouve qu'elle est équivalente à la méthode d'infection animale lorsqu'elle n'emploie pas de désinfectant [Rochelle et al., 2002]. Gargala et al. utilisent cette technique couplée à l'analyse immuno-enzymatique pour l'étude d'inhibiteurs sur des tapis cellulaires infectés [Gargala et al., 1999].

1.4.4 Les outils miniaturisés

Taguchi et al. ont intégré une micro-grille en acier dont la dimension des pores est inférieure au diamètre du parasite dans un système microfluidique [Taguchi et al., 2007]. Ce système utilise un marquage fluorescent en vue d'un comptage manuel, mais il a l'avantage de s'affranchir de la séparation immunomagnétique. Zhu et al. ont conçu un filtre à parasites grâce à une configuration particulière du micro-canal principal [Zhu et al., 2004]. La détection optique d'ARNm (ARN messenger) a été employée dans un dispositif microfluidique pour l'évaluation de la viabilité de *Cryptosporidium parvum* avec une limite de détection de 0,4fmol/ μ L [Esch et al., 2001]. Cette limite très basse est possible grâce à l'emploi d'un fluorophore particulier composé de liposomes.

Le système microfluidique développé par Ramadan et al. est une reproduction miniature et automatisée de l'étape classique de séparation immuno-magnétique et de purification des parasites [Ramadan & Christophe, 2009]. A l'aide d'aimants pivotants en réseau le long d'un canal, les parasites sont immobilisés séquentiellement et purifiés par le flux de liquide. Un comptage optique finalise la détection.

Des laboratoires sur puce basés sur une détection mécanique du parasite ont des performances très honorables. Nous pouvons citer les travaux de Poitras et al. qui utilisent la technique de

microbalance à quartz pour atteindre une sensibilité de 100 oocystes/mL [Poitras et al., 2009]. L'emploi d'une micro-poutre lié à une détection piézoélectrique a permis de détecter des oocystes sur une plage de 50 à 10^4 oocystes/mL [Xu & Mutharasan, 2010].

La détection électrique est une méthode également étudiée. Goater et al. avait employé la twDEP (travelling-wave Dielectrophorèse) et l'électrorotation pour la concentration et la détermination de la viabilité de *C. parvum* avec des concentration de 10000 oocystes/mL [Goater et al., 1997]. Plus récemment, Houssin et al. ont intégré des microélectrodes de métal pour la quantification de la concentration d'oocystes par spectroscopie d'impédance sur une gamme de 10^5 à 10^6 oocystes/mL [Houssin et al., 2010].

1.5 Un Lab-On-Chip comme solution d'analyse du pouvoir infectieux

La détection de pathogènes dans l'eau est importante pour prévenir le risque et assainir les eaux avec un traitement approprié. Cependant, il est absolument nécessaire d'apporter plus d'information que la simple présence du parasite. En effet, un parasite non-infectieux ne présente aucun risque pour la santé animale et humaine. De plus, l'étude du pouvoir infectieux est primordiale pour l'avancée des connaissances dans le domaine mais aussi pour le développement d'agents ou de procédures d'inactivation efficaces.

Nous avons vu précédemment que la méthode de mesure du pouvoir infectieux de *Cryptosporidium parvum* est l'infection de souriceaux nouveaux nés ou de souriceaux adultes immunodéprimés [Certad et al., 2007, Certad et al., 2010]. Cette méthode par expérimentation animale, lourde et problématique d'un point de vue éthique, peut être remplacée par la technique d'infestation de cellules en culture *in vitro*. Il reste tout de même beaucoup d'interrogations, notamment sur le fait que le parasite ne se multiplie pas sur des tapis cellulaire en culture [Rochelle et al., 2002], ou encore que les phénomènes d'infestations présentent des résultats inattendus en présence de désinfectants [Robertson & Gjerde, 2007]. Le pouvoir pathogène du parasite et ses effets sur l'hôte sont toujours sujets d'études, avec par exemple, l'utilisation de moyens modernes et peu conventionnels pour ce type de problématique comme la microscopie électronique [Valigurová et al., 2007].

Dans ce contexte, nous proposons de développer un système de mesure du pouvoir infectieux basé sur les technologies de la microfluidique et des laboratoires sur puce. Les avantages apportés par ces technologies sont immenses, notamment la réduction des coûts et des consommables/réactifs, la programmabilité et l'automatisation. Nous souhaitons développer un système capable de mesurer la réponse électrique d'un tapis cellulaire infecté par le parasite en microenvironnement.

La culture de cellules au sein de systèmes microfluidiques est en plein développement, comme le montre les travaux de co-culture de cellules épithéliales pour l'investigation d'interactions hôtes/pathogènes [Kim et al., 2010]. Des cellules intestinales ont été cultivées et contrôlées en ligne dans un système de microcanaux [Kimura et al., 2008]. Barbulovic et al. ont réussi à cultiver et maintenir en vie des cellules dans un dispositif de microfluidique de déplacement de goutte par électromouillage [Barbulovic-Nad et al., 2010].

L'emploi de cellules biologiques en tant que récepteur d'informations dans les biocapteurs n'est pas nouveau et fait l'objet de développements récents. Nous pouvons citer en exemple les travaux de Komaitis et al. sur la mesure de toxicité de métaux lourds présents dans l'eau (comme le plomb, le cuivre et le mercure) basée sur la réponse bioluminescente de bactéries en suspension [Komaitis et al., 2010].

La détection électrique pour l'investigation des modifications cellulaires des globules rouges induites par l'infection de *Babesia bovis* a été employée dans un système microfluidique de cytomètre en flux [Küttel et al., 2007]. Dans notre équipe, un système de mesure par spectroscopie d'impédance de la concentration en parasite a été développé, intégrant des microélectrodes planaires dans des canaux microfluidiques [Houssin et al., 2010].

Nous avons vu que les méthodes traditionnelles pour la détection de microorganismes n'est pas optimale du fait de la complexité des échantillons et de la lourdeur des méthodes d'analyses pour des entités spécifiques. Actuellement, les analyses de routine se limitent à la détection de pathogènes indicateurs tels que *E. Coli*.

L'avènement d'outils miniaturisés est en cours et certains systèmes présentent un réel potentiel (comme la plateforme développer par Grow et al. basée sur la microscopie Raman [Grow et al., 2003]). Cependant, la percée commerciale n'a pas encore eu lieu du fait des verrous existants, notamment au niveau de la préparation de l'échantillon sur puce.

Concernant le volet plus particulier de l'étude d'agents infectieux, notamment de parasites du genre *Cryptosporidium*, les méthodes actuelles reposent essentiellement sur l'analyse en laboratoire classique. La méthode de référence de la mesure du pouvoir infectieux est une méthode basée sur l'infection directe d'animaux de laboratoire. Cette technique est très lourde en moyens matériels (animalerie, techniciens) et éthiquement discutable.

Des outils microfluidiques émergent, ils apportent de l'information sur la présence du parasite, sa viabilité, mais pas sur son pouvoir infectieux. Il n'existe pas à ce jour de plateforme complète capable de mener une expérimentation totalement automatisée, de la préparation de l'échantillon à l'analyse de l'infectivité. De plus, certaines méthodes sont très spécifiques car elles emploient des techniques d'immuno-marquages.

Notre solution est la proposition d'une plateforme microfluidique intégrant la préparation d'un échantillon d'ocystes de *Cryptosporidium parvum* d'une centaine de nanolitres, à partir d'un volume de quelques microlitres, jusqu'à la mesure électrique du pouvoir infectieux par l'infestation de tapis cellulaires spécifiquement choisis de quelques centaines de μm^2 . L'analyse électrique présente l'avantage d'être sans marquage.

Cet état des lieux général met en lumière la légitimité et la pertinence du système envisagé. Le laboratoire sur puce imaginé pourrait être une alternative aux techniques d'infection animale et *in vitro* actuels. Ce système apporterait un contrôle accru de l'environnement de culture et une simplification de l'analyse des données du fait du faible nombre de cellules. Le deuxième avantage attendu est une sensibilité accrue pour une meilleure étude des phénomènes d'inactivation par des désinfectants ou des molécules à visées thérapeutiques. Enfin, le changement de type cellulaire en tant que bio-récepteur ajouterait de la souplesse au système, élargissant le champ applicatif.

Bibliographie du chapitre 1

[Alonso & Cuesta, 2010] Alonso, J. L. & Cuesta, G. (2010). Cryptosporidium oocysts and giardia cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection* 174, 73, 1138–1140.

[Arrowood, 2002] Arrowood, M. J. (2002). In vitro cultivation of cryptosporidium species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3), 390–400.

[Barbosa et al., 2008] Barbosa, J. M. M., Costa-de Oliveira, S., Rodrigues, A. G., Hanscheid, T., Shapiro, H., & Pina-Vaz, C. (2008). A flow cytometric protocol for detection of cryptosporidium spp. *Cytometry Part A*, 73A(1), 44–47.

[Barbulovic-Nad et al., 2010] Barbulovic-Nad, I., Au, S. H., & Wheeler, A. R. (2010). A microfluidic platform for complete mammalian cell culture. *Lab Chip*, 10, 1536–1542.

[Beaton et al., 2011] Beaton, A. D., Sieben, V. J., Floquet, C. F., Waugh, E. M., Bey, S. A. K., Ogilvie, I. R., Mowlem, M. C., & Morgan, H. (2011). An automated microfluidic colourimetric sensor applied in situ to determine nitrite concentration. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156(2), 1009–1014.

[Birnbaumer et al., 2009] Birnbaumer, G. M., Lieberzeit, P. A., Richter, L., Schirhagl, R., Milnera, M., Dickert, F. L., Bailey, A., & Ertl, P. (2009). Detection of viruses with molecularly imprinted polymers integrated on a microfluidic biochip using contact-less dielectric microsensors. *Lab Chip*, 9, 3549–3556.

[Bolong et al., 2009] Bolong, N., Ismail, A., Salim, M., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1-3), 229–246.

[Bouزيد et al., 2008] Bouزيد, M., Steverding, D., & Tyler, K. M. (2008). Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 302–306.

[Cabral et al., 2009] Cabral, C., Lucas, P., & Gordon, D. (2009). *Estimating the health impacts of unsafe drinking water in developing country contexts*. Technical Report 1, Aquatest Working Paper N°1.

[Certad et al., 2010] Certad, G., Creusy, C., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Pinon, A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Praet, M., Cuvelier, C., & Dei-Cas, E. (2010). Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in scid mice infected with cryptosporidium parvum tum1 strain. *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1469–1475.

[Certad et al., 2007] Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J.-C., Dei-Cas, E., & Creusy, C. (2007). Cryptosporidium parvum, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious Agents and Cancer*, 2(1), 22.

[Chalmers & Giles, 2010] Chalmers, R. & Giles, M. (2010). Zoonotic cryptosporidiosis in the uk - challenges for control. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1487–1497.

[Chang et al., 2005] Chang, I.-H., Tulock, J. J., Liu, J., Kim, W.-S., Cannon, D. M., Lu, Y., Bohn, P. W., Sweedler, J. V., & Crokek, D. M. (2005). Miniaturized lead sensor based on lead-specific dnzyme in a nanocapillary interconnected microfluidic device. *Environmental Science & Technology*, 39(10), 3756–3761.

[Chauret et al., 2001] Chauret, C. P., Radziminski, C. Z., Lepuil, M., Creason, R., & Andrews, R. C. (2001). Chlorine dioxide inactivation of cryptosporidium parvum oocysts and bacterial spore indicators. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7), 2993–3001.

[Chiappini et al., 2010] Chiappini, S. A., Kormes, D. J., Bonetto, M. C., Sacco, N., & Cortón, E. (2010). A new microbial biosensor for organic water pollution based on measurement of carbon dioxide production. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 148(1), 103–109.

[Chow & Du, 2011] Chow, K.-S. & Du, H. (2011). Dielectrophoretic characterization and trapping of different waterborne pathogen in continuous flow manner. *Sensors and Actuators A: Physical*, 170, 24–31.

[Cleary et al., 2008] Cleary, J., Slater, C., McGraw, C., & Diamond, D. (2008). An autonomous microfluidic sensor for phosphate: On-site analysis of treated wastewater. *Sensors Journal, IEEE*, 8(5), 508–515.

[Cummins et al., 2010] Cummins, E., Kennedy, R., & Cormican, M. (2010). Quantitative risk assessment of cryptosporidium in tap water in ireland. *Science of The Total Environment*, 408(4), 740–753.

[Dalton et al., 2001] Dalton, C., Goater, A. D., Drysdale, J., & Pethig, R. (2001). Parasite viability by electrorotation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195(1-3), 263–268.

[de Graaf et al., 1999] de Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., & Peeters, J. E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1269–1287.

[DiGiorgio et al., 2002] DiGiorgio, C. L., Gonzalez, D. A., & Huitt, C. C. (2002). Cryptosporidium and giardia recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(12), 5952–5955.

[DuPont et al., 1995] DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. (1995). The infectivity of cryptosporidium parvum in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332(13), 855–859.

[Dutse & Yusof, 2011] Dutse, S. W. & Yusof, N. A. (2011). Microfluidics-based lab-on-chip systems in dna-based biosensing: An overview. *Sensors*, 11(6), 5754–5768.

[Edgar et al., 2006] Edgar, R., McKinstry, M., Hwang, J., Oppenheim, A. B., Fekete, R. A., Giulian, G., Merrill, C., Nagashima, K., & Adhya, S. (2006). High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4841–4845.

[Esch et al., 2001] Esch, M. B., Locascio, L. E., Tarlov, M. J., & Durst, R. A. (2001). Detection of viable cryptosporidium parvum using dna-modified liposomes in a microfluidic chip. *Analytical Chemistry*, 73(13), 2952–2958.

[Fayer, 2004] Fayer, R. (2004). Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 37–56.

[Fayer, 2010] Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in cryptosporidium. *Experimental Parasitology*, 124(1), 90–97.

[Figueras & Borrego, 2010] Figueras, M. J. & Borrego, J. J. (2010). New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(12), 4179–4202.

[Gargala et al., 1999] Gargala, G., Delaunay, A., Favennec, L., Brasseur, P., & Ballet, J. J. (1999). Enzyme immunoassay detection of cryptosporidium parvum inhibition by sinefungin in sporozoite infected hct-8 enterocytic cells. *International Journal for Parasitology*, 29(5), 703–709.

[Gassara et al., 2012] Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2012). Trends in biological degradation of cyanobacteria and toxins. In A. Malik & E. Grohmann (Eds.), *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*, Strategies for Sustainability (pp. 261–294). Springer Netherlands. 10.1007/978-94-007-1591-2_8.

[Gilbride et al., 2006] Gilbride, K., Lee, D.-Y., & Beaudette, L. (2006). Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 1–20.

[Glasgow et al., 2004] Glasgow, H. B., Burkholder, J. M., Reed, R. E., Lewitus, A. J., & Kleinman, J. E. (2004). Real-time remote monitoring of water quality: a review of current applications, and advancements in sensor, telemetry, and computing technologies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1-2), 409–448.

[Goater et al., 1997] Goater, A., Burt, J., & Pethig, R. (1997). A combined travelling wave dielectrophoresis and electrorotation device: applied to the concentration and viability determination of cryptosporidium. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 30(18), L65–L69.

[Grow et al., 2003] Grow, A. E., Wood, L. L., Claycomb, J. L., & Thompson, P. A. (2003). New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 221–233.

[Hagens & Loessner, 2007] Hagens, S. & Loessner, M. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 513–519.

[Hamilton et al., 2006] Hamilton, A. J., Versace, V. L., Stagnitti, F., Li, P., Yin, W., Maher, P., Hermon, K., Premier, R. R., & Ierodiaconou, D. (2006). Balancing environmental impacts and benefits of wastewater reuse. *WSEAS transactions on environment and development*, 2, 117–129.

[Han et al., 2008] Han, J.-H., Heinze, B. C., & Yoon, J.-Y. (2008). Single cell level detection of escherichia coli in microfluidic device. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(8), 1303–1306.

[Houssin et al., 2010] Houssin, T., Follet, J., Follet, A., Dei-Cas, E., & Senez, V. (2010). Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5), 1122–1129.

[Jang et al., 2011] Jang, A., Zou, Z., Lee, K. K., Ahn, C. H., & Bishop, P. L. (2011). State-of-the-art lab chip sensors for environmental water monitoring. *Measurement Science and Technology*, 22(3), 032001.

[Jenkins et al., 2000] Jenkins, M. C., Trout, J., Abrahamsen, M. S., Lancto, C. A., Higgins, J., & Fayer, R. (2000). Estimating viability of cryptosporidium parvum oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rt-pcr) directed at mrna encoding amyloglucosidase. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 97–106.

[Jex et al., 2008] Jex, A., Smith, H., Monis, P., Campbell, B., & Gasser, R. (2008). Cryptosporidium – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26(4), 304 – 317.

[Jo et al., 2011] Jo, M., Ahn, J.-Y., Lee, J., Lee, S., Hong, S. W., Yoo, J.-W., Kang, J., Dua, P., Lee, D.-k., Hong, S., & Kim, S. (2011). Development of single-stranded dna aptamers for specific bisphenol a detection. *Oligonucleotides*, 21(2), 85–91.

[Jung et al., 2011] Jung, W., Jang, A., Bishop, P. L., & Ahn, C. H. (2011). A polymer lab chip sensor with microfabricated planar silver electrode for continuous and on-site heavy metal measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155(1), 145–153.

[Kang et al., 2006] Kang, C. D., Lee, S. W., Park, T. H., & Sim, S. J. (2006). Performance enhancement of real-time detection of protozoan parasite, cryptosporidium oocyst by a modified surface plasmon resonance (spr) biosensor. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 387–390.

[Karanis et al., 2007] Karanis, P., Kourenti, C., & Smith, H. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal Of Water And Health*, 5(1), 1–38.

[Kim et al., 2010] Kim, J., Hegde, M., & Jayaraman, A. (2010). Co-culture of epithelial cells and bacteria for investigating host-pathogen interactions. *Lab Chip*, 10, 43–50.

[Kimura et al., 2008] Kimura, H., Yamamoto, T., Sakai, H., Sakai, Y., & Fujii, T. (2008). An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab on a Chip*, 8(5), 741–746.

[Kolpin et al., 2002] Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in u.s. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), 1202–1211.

[Komaitis et al., 2010] Komaitis, E., Vasiliou, E., Kremmydas, G., Georgakopoulos, D. G., & Georgiou, C. (2010). Development of a fully automated flow injection analyzer implementing bioluminescent biosensors for water toxicity assessment. *Sensors*, 10(8), 7089–7098.

[Kostrzynska & Bachand, 2006] Kostrzynska, M. & Bachand, A. (2006). Application of dna microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1), 1–8.

[Küttel et al., 2007] Küttel, C., Nascimento, E., Demierre, N., Silva, T., Braschler, T., Renaud, P., & Oliva, A. G. (2007). Label-free detection of babesia bovis infected red blood cells using impedance spectroscopy on a microfabricated flow cytometer. *Acta Tropica*, 102(1), 63–68.

[Kwon et al., 2010] Kwon, H.-J., Dean, Z. S., Angus, S. V., & Yoon, J.-Y. (2010). Lab-on-a-chip for field escherichia coli assays: Long-term stability of reagents and automatic sampling system. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 15(3), 216–223.

[Lagally et al., 2004] Lagally, E. T., Scherer, J. R., Blazej, R. G., Toriello, N. M., Diep, B. A., Ramchandani, M., Sensabaugh, G. F., Riley, L. W., & Mathies, R. A. (2004). Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. *Analytical Chemistry*, 76(11), 3162–3170.

[Lakind et al., 2010] Lakind, J. S., Richardson, S. D., & Blount, B. C. (2010). The good, the bad, and the volatile: Can we have both healthy pools and healthy people? *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3205–3210.

[Lee et al., 2006] Lee, J.-G., Cheong, K. H., Huh, N., Kim, S., Choi, J.-W., & Ko, C. (2006). Microchip-based one step dna extraction and real-time pcr in one chamber for rapid pathogen identification. *Lab Chip*, 6, 886–895.

[Lee et al., 2010] Lee, W. G., Kim, Y.-G., Chung, B. G., Demirci, U., & Khademhosseini, A. (2010). Nano/microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4-5), 449–457.

[Leonard et al., 2003] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., & O’Kennedy, R. (2003). Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 3–13.

[Leskinen & Lim, 2008] Leskinen, S. D. & Lim, D. V. (2008). Rapid ultrafiltration concentration and biosensor detection of enterococci from large volumes of florida recreational water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(15), 4792–4798.

[Li et al., 2009] Li, X. X., Cao, C., Han, S. J., & Sim, S. J. (2009). Detection of pathogen based on the catalytic growth of gold nanocrystals. *Water Research*, 43(5), 1425–1431.

[Li et al., 2011] Li, Y., Zhang, C., & Xing, D. (2011). Integrated microfluidic reverse transcription-polymerase chain reaction for rapid detection of food- or waterborne pathogenic rotavirus. *Analytical Biochemistry*, 415(2), 87–96.

[Liu & Zhu, 2005] Liu, W.-T. & Zhu, L. (2005). Environmental microbiology-on-a-chip and its future impacts. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 174–179.

[Long et al., 2008] Long, F., He, M., Shi, H., & Zhu, A. (2008). Development of evanescent wave all-fiber immunosensor for environmental water analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 952–958.

[Mac Kenzie et al., 1994] Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., & Davis, J. P. (1994). A massive outbreak in milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 331(3), 161–167.

[Mairhofer et al., 2009] Mairhofer, J., Roppert, K., & Ertl, P. (2009). Microfluidic systems for pathogen sensing: A review. *Sensors*, 9(6), 4804–4823.

[Mark et al., 2010] Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F., & Zengerle, R. (2010). Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1153–1182.

[Meltzer et al., 2011] Meltzer, R. H., Krogmeier, J. R., Kwok, L. W., Allen, R., Crane, B., Griffis, J. W., Knaian, L., Kojanian, N., Malkin, G., Nahas, M. K., Papkov, V., Shaikh, S., Vyavahare, K., Zhong, Q., Zhou, Y., Larson, J. W., & Gilmanshin, R. (2011). A lab-on-chip for biothreat detection using single-molecule dna mapping. *Lab Chip*, 11, 863–873.

[Miège et al., 2009] Miège, C., Bados, P., Brosse, C., & Coquery, M. (2009). Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(2), 237–244.

[Montemayor et al., 2007] Montemayor, M., Galofré, B., Ribas, F., & Lucena, F. (2007). Comparative study between two laser scanning cytometers and epifluorescence microscopy for the detection of cryptosporidium oocysts in water. *Cytometry Part A*, 71A(3), 163–169.

[Moore et al., 2007] Moore, J. E., Cherie Millar, B., Kenny, F., Lowery, C. J., Xiao, L., Rao, J. R., Nicholson, V., Watabe, M., Heaney, N., Sunnotel, O., McCorry, K., Rooney, P. J., Snelling, W. J., & Dooley, J. S. G. (2007). Detection of cryptosporidium parvum in lettuce. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(4), 385–393.

[Morgan & Thompson, 1998] Morgan, U. & Thompson, R. (1998). Pcr detection of cryptosporidium: The way forward? *Parasitology Today*, 14(6), 241–245.

[Mosier-Boss et al., 2003] Mosier-Boss, P. A., Lieberman, S. H., Andrews, J. M., Rohwer, F. L., Wegley, L. E., & Breitbart, M. (2003). Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species. *Appl. Spectrosc.*, 57(9), 1138–144.

[Neethirajan et al., 2011] Neethirajan, S., Kobayashi, I., Nakajima, M., Wu, D., Nandagopal, S., & Lin, F. (2011). Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries. *Lab Chip*, 11, 1574–1586.

[Neumann et al., 2000a] Neumann, N. F., Gyürék, L. L., Finch, G. R., & Belosevic, M. (2000a). Intact cryptosporidium parvum oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiology Letters*, 183(2), 331–336.

[Neumann et al., 2000b] Neumann, N. F., Gyurek, L. L., Gammie, L., Finch, G. R., & Belosevic, M. (2000b). Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of cryptosporidium parvum viability in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1), 406–412.

[Oh et al., 2011] Oh, S.-E., Hassan, S. H., & Ginkel, S. W. V. (2011). A novel biosensor for detecting toxicity in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 154(1), 17–21.

[O'Hara & Chen, 2011] O'Hara, S. P. & Chen, X.-M. (2011). The cell biology of cryptosporidium infection. *Microbes and Infection*, 13(8-9), 721–730.

[Ortega-Pierres et al., 2009] Ortega-Pierres, G., Smith, H. V., Cacciò, S. M., & Thompson, R. A. (2009). New tools provide further insights into giardia and cryptosporidium biology. *Trends in Parasitology*, 25(9), 410–416.

[Poitras et al., 2009] Poitras, C., Fatisson, J., & Tufenkji, N. (2009). Real-time microgravimetric quantification of cryptosporidium parvum in the presence of potential interferents. *Water Research*, 43(10), 2631–2638.

[Putignani & Menichella, 2010] Putignani, L. & Menichella, D. (2010). Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2010, Article ID 753512, 39 pages, 2010. doi:10.1155/2010/753512.

[Quilliam et al., 2011] Quilliam, R. S., Williams, A. P., Avery, L. M., Malham, S. K., & Jones, D. L. (2011). Unearthing human pathogens at the agricultural-environment interface: A review of current methods for the detection of escherichia coli o157 in freshwater ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3-4), 354–360.

[Ramadan & Christophe, 2009] Ramadan, Q. & Christophe, L. (2009). Individual cells immobilization for water-borne pathogen detection and enumeration. *Procedia Chemistry*, 1(1), 337–340.

[Ramalingam et al., 2010] Ramalingam, N., Rui, Z., Liu, H.-B., Dai, C.-C., Kaushik, R., Ratnahraka, B., & Gong, H.-Q. (2010). Real-time pcr-based microfluidic array chip for simultaneous detection of multiple waterborne pathogens. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(1), 543–552.

- [Ratanachoo et al., 2002] Ratanachoo, K., Gascoyne, P. R. C., & Ruchirawat, M. (2002). Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1564(2), 449–458.
- [Robertson & Gjerde, 2007] Robertson, L. J. & Gjerde, B. K. (2007). Cryptosporidium oocysts: challenging adversaries? *Trends in Parasitology*, 23(8), 344–347.
- [Rochelle et al., 2002] Rochelle, P. A., Marshall, M. M., Mead, J. R., Johnson, A. M., Korich, D. G., Rosen, J. S., & De Leon, R. (2002). Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of cryptosporidium parvum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(8), 3809–3817.
- [Rodriguez-Mozaz et al., 2007] Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L., & Barceló, D. (2007). Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 97–115.
- [Rogers et al., 2002] Rogers, D. J., Randolph, S. E., Snow, R. W., & Hay, S. I. (2002). Satellite imagery in the study and forecast of malaria. *Nature*, 415(6872), 710–715.
- [Rule & Vikesland, 2009] Rule, K. L. & Vikesland, P. J. (2009). Surface-enhanced resonance raman spectroscopy for the rapid detection of cryptosporidium parvum and giardia lamblia. *Environmental Science & Technology*, 43(4), 1147–1152.
- [Schaap et al., 2011] Schaap, A., Bellouard, Y., & Rohrlack, T. (2011). Optofluidic lab-on-a-chip for rapid algae population screening. *Biomed. Opt. Express*, 2(3), 658–664.
- [Schulze et al., 2009] Schulze, H., Giraud, G., Crain, J., & Bachmann, T. T. (2009). Multiplexed optical pathogen detection with lab-on-a-chip devices. *Journal of Biophotonics*, 2(4), 199–211.
- [Shannon et al., 2008] Shannon, M. A., Bohn, P. W., Elimelech, M., Georgiadis, J. G., nas, M. B. J., & Mayes, A. M. (2008). Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452, 301–310.

[Shedd et al., 2001] Shedd, T. R., van der Schalie, W. H., Widder, M. W., Burton, D. T., & Burrows, E. P. (2001). Long-term operation of an automated fish biomonitoring system for continuous effluent acute toxicity surveillance. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66, 392–399.

[Slater et al., 2010] Slater, C., Cleary, J., Lau, K.-T., Snakenborg, D., Corcoran, B., Kutter, J., & Diamond, D. (2010). Validation of a fully autonomous phosphate analyser based on a microfluidic lab-on-a-chip. *Water Science & Technology - WST*, 61, 1811–1818.

[Slifko et al., 2000] Slifko, T. R., Smith, H. V., & Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1379–1393.

[Smith & Nichols, 2010] Smith, H. V. & Nichols, R. A. (2010). Cryptosporidium: Detection in water and food. *Experimental Parasitology*, 124(1), 61–79.

[Snelling et al., 2007] Snelling, W. J., Lihua, X., Guadalupe, O.-P., J., L. C., E., M. J., R., R. J., Stephen, S., B., C. M., J., R. P., Motoo, M., Fiona, K., Jiru, X., & S.G., D. J. (2007). Cryptosporidiosis in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 1, 242–256.

[Straub & Chandler, 2003] Straub, T. M. & Chandler, D. P. (2003). Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 185–197.

[Sun et al., 2009] Sun, H., Choy, T., Zhu, D., Yam, W., & Fung, Y. (2009). Nano-silver-modified pqc/dna biosensor for detecting e. coli in environmental water. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1405–1410.

[Sunnotel et al., 2006] Sunnotel, O., Lowery, C., Moore, J., Dooley, J., Xiao, L., Millar, B., Rooney, P., & Snelling, W. (2006). Cryptosporidium. *Letters in Applied Microbiology*, 43(1), 7–16.

[Taguchi et al., 2007] Taguchi, T., Arakaki, A., Takeyama, H., Haraguchi, S., Yoshino, M., Kaneko, M., Ishimori, Y., & Matsunaga, T. (2007). Detection of cryptosporidium parvum

oocysts using a microfluidic device equipped with the sus micromesh and fitc-labeled antibody. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2), 272–280.

[Theytaz et al., 2009] Theytaz, J., Braschler, T., van Lintel, H., Renaud, P., Diesel, E., Merulla, D., & van der Meer, J. (2009). Biochip with e. coli bacteria for detection of arsenic in drinking water. *Procedia Chemistry*, 1(1), 1003–1006.

[Tumwine et al., 2005] Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Bakeera-Kitaka, S., Ndeezi, G., Downing, R., Feng, X., Akiyoshi, D. E., & Tzipori, S. (2005). Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg*, 73(5), 921–925.

[Tzipori & Widmer, 2008] Tzipori, S. & Widmer, G. (2008). A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 24(4), 184–189.

[USEPA, 2005] USEPA (2005). *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA* (<http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>).

[Valdez et al., 1997] Valdez, L., Dang, H., Okhuysen, P., & Chappell, C. (1997). Flow cytometric detection of cryptosporidium oocysts in human stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 35(8), 2013–2017.

[Valigurová et al., 2007] Valigurová, A., Jirku, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modrý, D., & Slapeta, J. (2007). Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology*, 38, 913–922.

[Velusamy et al., 2010] Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2), 232–254.

[Vikesland & Wigginton, 2010] Vikesland, P. J. & Wigginton, K. R. (2010). Nanomaterial enabled biosensors for pathogen monitoring - a review. *Environmental Science & Technology*, 44(10), 3656–3669.

[Waggoner & Craighead, 2007] Waggoner, P. S. & Craighead, H. G. (2007). Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab Chip*, 7, 1238–1255.

[Wagner-Wiening & Kimmig, 1995] Wagner-Wiening, C. & Kimmig, P. (1995). Detection of viable cryptosporidium parvum oocysts by pcr. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(12), 4514–4516.

[Wang et al., 1997] Wang, J., Rivas, G., Parrado, C., Cai, X., & Flair, M. N. (1997). Electrochemical biosensor for detecting dna sequences from the pathogenic protozoan cryptosporidium parvum. *Talanta*, 44(11), 2003–2010. In Honour of Professor George-Emil Baiulescu.

[(WHO), 2007] (WHO), W. H. O. (2007). *The world health report 2007 - A safer future: global public health security in the 21st century*. Technical report, WHO, Geneva, Switzerland.

[Widmer, 1998] Widmer, G. (1998). Genetic heterogeneity and pcr detection of cryptosporidium parvum. In S. Tzipori (Ed.), *Opportunistic Protozoa in Humans*, volume 40 of *Advances in Parasitology* (pp. 223–239). Academic Press.

[Xiao & Ryan, 2004] Xiao, L. & Ryan, U. M. (2004). Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(5), 483–490.

[Xu & Mutharasan, 2010] Xu, S. & Mutharasan, R. (2010). Detection of cryptosporidium parvum in buffer and in complex matrix using pemc sensors at 5 oocysts ml⁻¹. *Analytica Chimica Acta*, 669(1-2), 81–86.

[Yang et al., 2010] Yang, M., Sun, S., Kostov, Y., & Rasooly, A. (2010). Lab-on-a-chip for carbon nanotubes based immunoassay detection of staphylococcal enterotoxin b (seb). *Lab Chip*, 10, 1011–1017.

[Yeo et al., 2011] Yeo, L. Y., Chang, H.-C., Chan, P. P. Y., & Friend, J. R. (2011). Microfluidic devices for bioapplications. *Small*, 7(1), 12–48.

[Zhou et al., 2011] Zhou, G., Wen, S., Liu, Y., Li, R., Zhong, X., Feng, L., Wang, L., & Cao, B. (2011). Development of a dna microarray for detection and identification of legionella pneumophila and ten other pathogens in drinking water. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 293–300.

[Zhu et al., 2004] Zhu, L., Zhang, Q., Feng, H., Ang, S., Chau, F. S., & Liu, W.-T. (2004). Filter-based microfluidic device as a platform for immunofluorescent assay of microbial cells. *Lab Chip*, 4, 337–341.

2 : Présentation des fonctions du système, des technologies employées et premiers résultats de concentration

2.1 Préambule

L'objectif de ces travaux est de fabriquer un système de mesure du pouvoir infectieux d'un agent pathogène. Il doit être capable de concentrer les particules biologiques à analyser dans un système de microfluidique en goutte, dite discrète. Les échantillons créés ont un volume variant de la centaine de nanolitres à quelques microlitres. Ces gouttes d'analytes sont envoyées vers une zone d'analyse utilisant la technique de spectroscopie d'impédance. La technologie utilisée pour le déplacement de goutte est la technique d'électromouillage (bien développée à l'IEMN). Cette technique de convoyage est une méthode électrique. Afin de simplifier l'intégration, il a été choisi d'utiliser des moyens électriques pour remplir la fonction concentration. Ainsi, le système complet est tout électrique, de la préparation de l'échantillon, à son transport et son analyse.

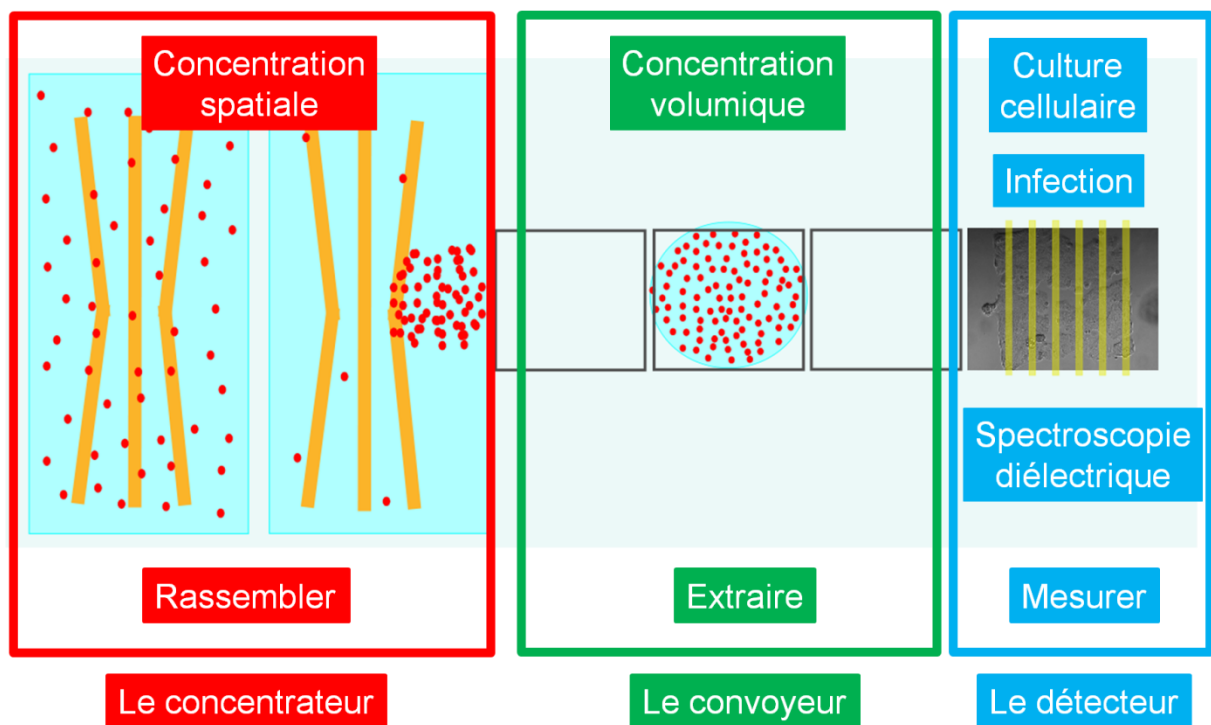


Figure 2.1: Schéma du système d'analyse d'infectivité in vitro. Présentation des fonctions générales.

La préparation de l'échantillon consiste à concentrer les particules en suspension dans un réservoir (volume de 1 à 10 μ l). Ces particules peuvent être des cellules, des parasites ou tout autre objet ayant une taille micrométrique. L'idée est de rassembler les particules en suspension aux bords de la goutte. Après rassemblement, les particules sont extraites dans une goutte fille de volume inférieur (< μ L) créée par électromouillage (EWOD) (cf. figure 2.2).

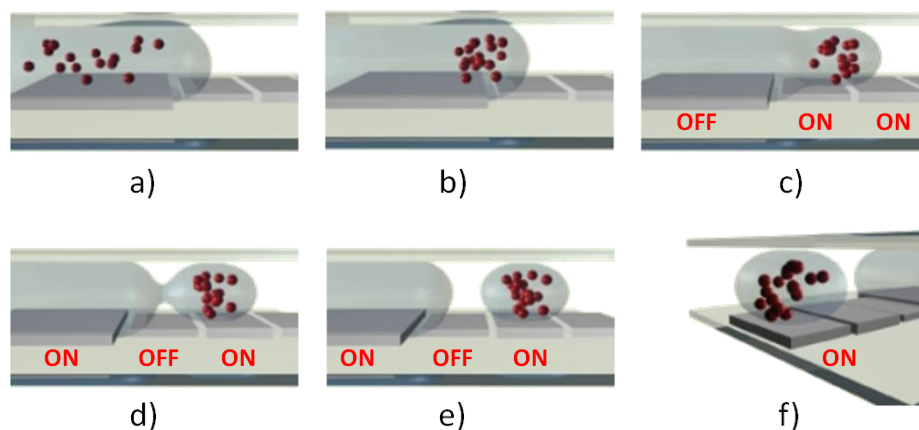


Figure 2.2 : Vue schématique 3D du système d'échantillonnage. Séquence temporelle de l'étape de concentration de particules en suspension dans une goutte d'eau. a) particules en suspension dans le réservoir, b) rassemblement des particules sur le bord de la goutte, c) création d'un doigt de liquide par électromouillage grâce à l'excitation électrique des électrodes, d) pincement du doigt de liquide par activation de l'électrode du réservoir, e) création de la goutte par coupure du doigt de liquide, f) déplacement de la goutte créée et des particules qu'elle contient.

Ce chapitre a pour objectif de présenter le raisonnement ayant conduit à l'élaboration du système de concentration. Dans un premier temps, la technologie EWOD est décrite ainsi que ses applications. Quelques techniques majeures de manipulation de micro-objets en microenvironnement sont exposées. La stratégie employée et le système de concentration sont présentés. Enfin, la présentation des premiers résultats expérimentaux met en évidence le besoin de comprendre plus finement les phénomènes participant au rassemblement de particules en suspension dans un liquide.

2.2 L'électromouillage sur diélectrique : EWOD

Le phénomène d'électrocapillarité est mis en évidence pour la première fois en 1875 par G. Lippmann avec une interface mercure-électrolyte [Lippmann, 1875]. L'électromouillage est la modification de la mouillabilité d'une surface par l'application d'une tension entre une goutte de liquide et la surface sur laquelle elle repose. Dans l'expérience de Lippmann, le mercure joue le rôle d'électrode. Lorsqu'une différence de potentiel est appliquée entre l'électrode et le liquide, l'accumulation de charges à l'interface diminue la tension interfaciale, ce qui se concrétise par une diminution de l'angle de contact entre le liquide et l'électrode.

Avec l'émergence des microtechnologies, ce phénomène est exploité par Bruno Berge et amélioré grâce au dépôt d'un matériau diélectrique hydrophobe sur l'électrode [Berge, 1993]. Le traitement de surface apporte une accumulation de charges plus importante et permet une plus grande variation d'angle de contact. Depuis, Bruno Berge a fondé Varioptic, une compagnie fabricant des lentilles dites « liquides » destinées aux objectifs d'appareils photo et caméras. Cet exemple n'est qu'un aperçu des potentialités de cette technique appelée électromouillage sur diélectrique (en anglais : Electrowetting On DiElectric, soit EWOD). D'autres applications sans rapport avec la microfluidique, telles que le « e-paper » [Kim & Steckl, 2010] et l'« écran electrowetting », sont décrites par l'équipe de B. Berge dans ce papier [Shamai et al., 2008].

Dans la suite de cette partie nous présentons le principe de l'EWOD ainsi que les paramètres importants pour le déplacement et la création de microgouttelettes. L'importance de l'hystérésis est explicitée, en lien avec la nécessité d'utiliser des surfaces superhydrophobes. Enfin quelques applications de laboratoires sur puce reposant sur cette méthode sont exposées.

2.2.1 Principe de l'électromouillage sur diélectrique

2.2.1.1 Equation de Lippmann-Young

Un système générique d'électromouillage se compose d'une surface conductrice remplissant le rôle d'électrode, recouverte par un diélectrique et un matériau hydrophobe (figure 2.3).

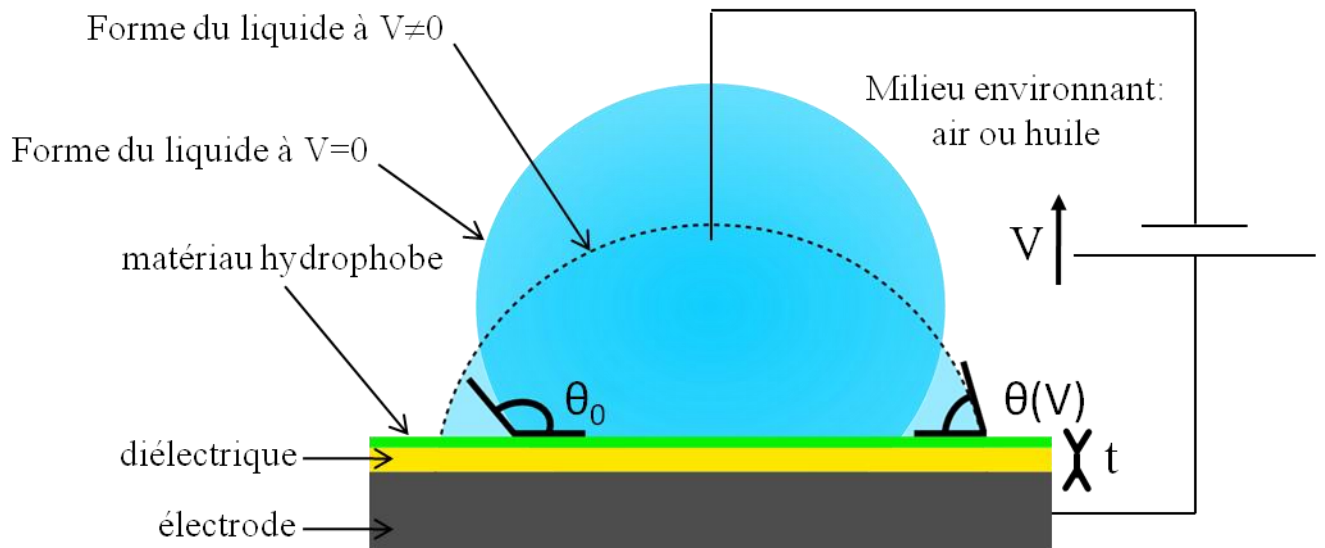


Figure 2.3 : Principe de l'électromouillage sur diélectrique. L'application d'une différence de potentiel entre un liquide et une surface conductrice provoque l'étalement de la goutte.

Bruno Berge a introduit l'équation de Lippmann-Young, décrivant la variation de l'angle de contact θ en fonction de la tension appliquée V [Berge, 1993]:

$$\cos \theta(V) = \cos \theta_0 + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2\gamma t} V^2 \quad (2.1)$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide égale à $8,8541 \cdot 10^{-12} \text{F/m}$, ϵ_r est la permittivité relative du matériau diélectrique, t son épaisseur, γ est la tension de surface liquide/gaz, θ_0 est l'angle de Young.

Cette équation rend compte de la variation de l'angle de contact apparent. Elle dépend du diélectrique employé et de son épaisseur (t), ainsi que de l'énergie de surface γ (qui s'exprime en mJ.m^{-2} ou en mN.m^{-1}). Mugele a démontré qu'il existe une distinction entre l'angle apparent (macroscopique) et l'angle de Young (microscopique) [Mugele, 2009, Mugele & Buehrle, 2007]. L'angle de Young ne change pas alors que l'angle apparent diminue avec la tension. D'après l'équation (2.1), cette diminution n'est pas limitée : une valeur nulle de l'angle de contact est permise. Cependant, au-delà d'une tension seuil, la valeur de l'angle de contact ne diminue plus : c'est le phénomène de saturation de l'angle de contact. Une discussion sur ce phénomène est disponible à la page 28 de la thèse de Florian Lapierre [Lapierre, 2011].

2.2.2 Electromouillage pour le déplacement de goutte

Le déplacement de goutte par électromouillage se fait grâce à un réseau d'électrodes adjacentes, activées séquentiellement. Une goutte de liquide recouvre en partie un réseau d'électrodes. Lorsqu'une électrode sous la goutte est polarisée, la propriété de la surface en regard, non-mouillante dans l'état non-polarisé, devient mouillante. On observe alors que la goutte s'étale au dessus de cette électrode. En coupant la tension de celle-ci tout en activant l'électrode adjacente, la goutte se déplace vers la zone voisine, rendue mouillante par l'application de la tension (cf. figure 2.4).

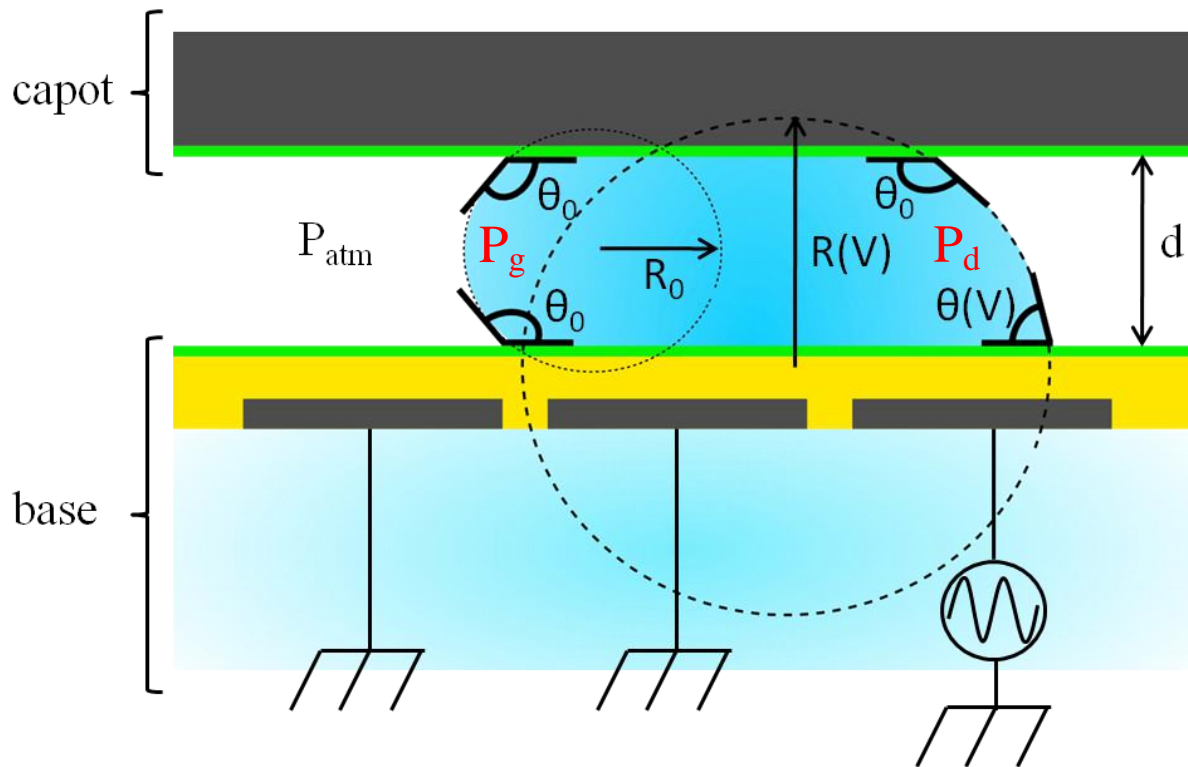


Figure 2.4 : Schéma de principe d'un déplacement de goutte par EWOD. L'angle à droite θ_a diminue au niveau de la ligne de contact en regard de l'électrode active, et le rayon de courbure $R(V)$ augmente.

Il existe deux types de configuration du système pour le déplacement (figure 2.5):

- un simple plan d'électrodes et de lignes de masse : configuration dite « 1D »
- un système où la goutte est encapsulée entre deux plans : configuration dite « 2D »

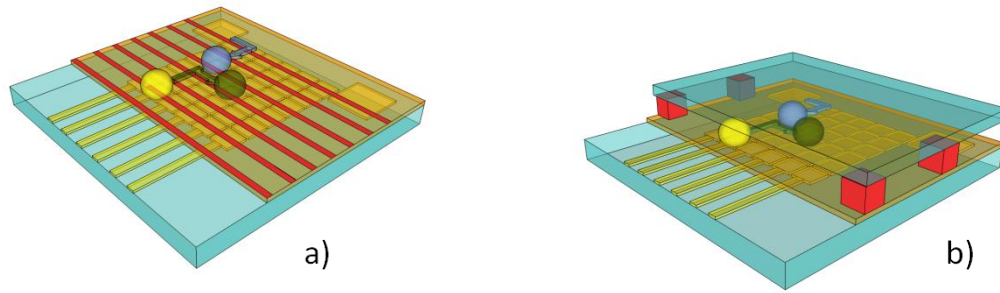


Figure 2.5 : Représentations 3D de configuration a) 1D et b) 2D d'un système matriciel de déplacement de goutte par EWOD. En 1D, la masse (en rouge sur le schéma 3D) et les électrodes d'actionnement sont sur la même base que le diélectrique. En 2D, la masse est connectée au capot⁹.

La force motrice F_m générée par le phénomène d'électromouillage peut être calculée grâce à un raisonnement sur les pressions. Lorsque l'électrode est activée l'angle $\theta(V)$ diminue et le rayon de courbure $R(V)$ augmente (cf. figure 2.4). Selon la loi de Laplace, ce changement de rayon de courbure induit un différentiel de pression au sein de la goutte :

$$\Delta P = P_g - P_d = \gamma \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R(V)} \right) > 0 \quad (2.2)$$

En exprimant R_0 et $R(V)$ en fonction des cosinus des angles, l'expression (1.2) devient :

$$\Delta P = \gamma \frac{\cos \theta(V) - \cos \theta_0}{d} \quad (2.3)$$

La force motrice F_m , par unité de longueur, qui permet le déplacement est déduite de l'équation (2.3) :

$$F_m = \gamma (\cos \theta(V) - \cos \theta_0) \quad (2.4)$$

⁹ Le capot peut recouvrir un système 1D, et de ce fait, ne pas être connecté à la masse. Cette configuration sera utilisée dans le système final.

En mettant en relation cette dernière expression de F_m avec l'équation de Lippmann-Young (équation (2.1)) on obtient :

$$F_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{2t} V^2 \quad (2.5)$$

Pour qu'un déplacement de liquide soit possible, il faut que cette force soit supérieure à la force due aux frottements de la goutte sur la surface, et s'opposant à son mouvement. Cette force se nomme force d'hystérésis (ou hystérésis).

2.2.3 L'hystérésis

L'hystérésis qualifie l'ancrage de la ligne de contact d'une goutte de liquide sur une surface. Elle est liée aux imperfections de la surface. Ces défauts peuvent être dus à la topologie physique de la surface (rugosité) ou à la présence de molécules organiques (imperfections d'origines chimiques).

L'hystérésis de mouillage est définie par la différence entre l'angle d'avancée et l'angle de reculée d'une goutte en déplacement sur une surface. Ces deux angles peuvent être mesurés par différentes méthodes telles que la méthode de l'inclinaison de la surface ou du gonflement de goutte (cf. figure 2.6).

Voici quelques mesures d'hystérésis pour divers matériaux hydrophobes, extraites de la thèse de Nicolas Verplanck, effectué à l'IEMN en 2007 [Verplanck, 2007].

Surface	Angle d'avancée θ_A (°)	Angle de reculée θ_R (°)	Hystérésis (°)
Téflon	125	112	13
Cytop	116	105	11
OTS	115	101	14
C ₄ F ₈	114	92	22

Tableau 2.1 : Hystérésis de différents matériaux, extraite de la thèse de Nicolas Verplanck.

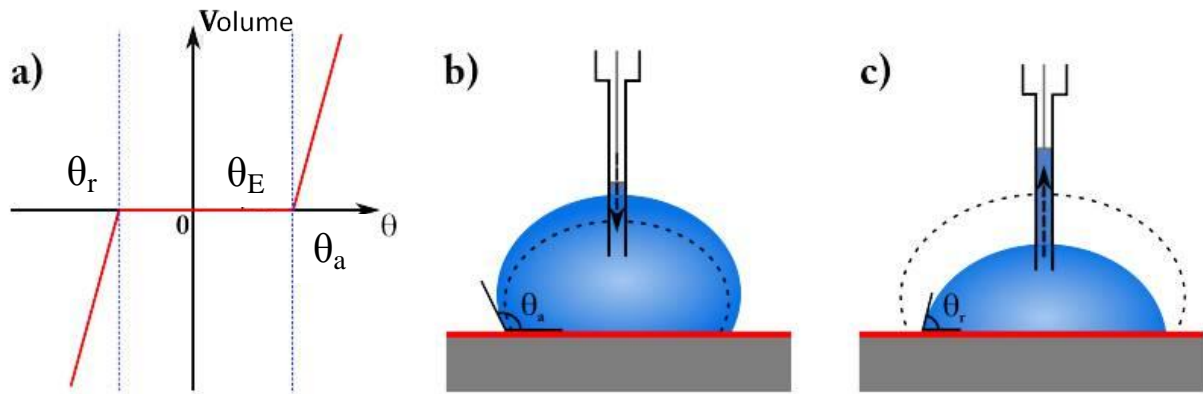


Figure 2.6 : a) Schéma représentatif de la mesure d'hystérésis. θ_r et θ_a sont les angles maximums pour lesquels la vitesse de la ligne de contact est nulle, θ_E est l'angle de contact apparent. (b-c) Principe de fonctionnement de la mesure d'angle d'hystérésis par gonflement de goutte. (b) La seringue injecte du liquide dans la goutte, l'angle d'avancée θ_a est mesuré. (c) La seringue aspire le liquide, l'angle de recul θ_r est obtenu [Lapierre, 2011].

Pour un système 2D, la force d'hystérésis F_H intervient sur deux surfaces, et s'écrit donc :

$$F_H = 2\gamma(\cos \theta_r - \cos \theta_a)$$

Le déplacement de la goutte s'effectue si la force motrice F_m est supérieure à F_H , soit :

$$\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{2t} V^2 > 2\gamma(\cos \theta_r - \cos \theta_a)$$

Il existe donc une tension minimale V_{\min} pour qu'il y ait déplacement. Le fait de réduire au maximum l'hystérésis permet de diminuer les tensions d'actionnement, et donc d'améliorer le déplacement.

Par conséquent, dans la suite de ces travaux, on utilise une surface superhydrophobe nanostructurée à hystérésis nulle comme capot dans le système de concentration et de création de goutte, développée par Gaël Piret [Piret, 2010]. Cette surface a été également employée en électromouillage pour de la caractérisation et du déplacement de goutte par Nicolas Verplanck [Verplanck, 2007, Verplanck et al., 2007] et Florian Lapierre [Lapierre, 2011].

2.2.4 Discussion sur la création de goutte

La technique d'électromouillage permet de réaliser des opérations microfluidiques de base telles que la scission, la fusion ou la création de goutte [Cho et al., 2003]. L'une des étapes importantes de la fonction « concentration » est l'extraction d'une partie du réservoir contenant un nombre importants de particules.

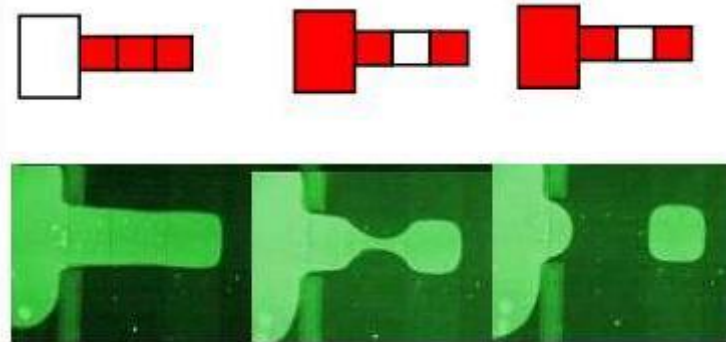


Figure 2.7 : Exemple de création de goutte dans un système EWOD où le liquide est environné d'huile. « Un doigt de liquide est extrait du réservoir sur trois électrodes de $800\mu\text{m} \times 800\mu\text{m}$. La coloration blanche de l'électrode signifie qu'elle est désactivée (ON). La coloration rouge de l'électrode signifie qu'elle est activée (ON). La désactivation de l'électrode centrale et le pompage vers le réservoir permet de casser le doigt en formant une goutte recouvrant parfaitement la troisième électrode. Des mesures de taille de gouttes ont révélé une précision remarquable (Coefficient de variation évoluant entre 1 et 3% suivant les puces) » [Fouillet, 2007].

La création de goutte est complexe car elle est très dépendante des paramètres du système. Les étapes de création de goutte sont illustrées figure 2.7. Un doigt de liquide est extrait du réservoir puis découpé par effet de pompage du réservoir et de la dernière électrode à l'extrémité du doigt. La phase de pincement du doigt de liquide et de la coupure du liquide en deux gouttes distinctes dépend fortement de la valeur de la tension de surface liquide/gaz (γ), du nombre d'électrodes actionnées pour la création du doigt, du rapport d'aspect entre la taille d'une électrode et la hauteur de la goutte (distance séparant les deux plans confinant la goutte)

ainsi que de l'épaisseur et de la permittivité du diélectrique. En sortie de ce processus de création de goutte, le contrôle du volume créé peut se faire par mesure capacitive [Ren et al., 2004].

Song et al. ont défini des lois d'échelle concernant les opérations de scission et création de goutte, afin d'apporter des pistes pour le dimensionnement de systèmes microfluidiques EWOD [Song et al., 2009]. Une équation simple définit la tension seuil à appliquer pour que l'opération de dispense de goutte ait lieu :

$$V_{disp} = \sqrt{V_t^2 + \frac{8\gamma t \frac{d}{L_{ewod}}}{\epsilon_0 \epsilon_r (N'^2 + 1)}} \quad (2.6)$$

V_t est la tension seuil d'actionnement. Dans la configuration du système utilisé dans ce travail, $V_t = 65V$. γ est la tension de surface de l'interface. Dans notre cas, $\gamma = 72.8 \text{ mN/m}$. t est l'épaisseur du diélectrique, d est la hauteur de la goutte (distance entre les deux plans encapsulant le liquide), L_{ewod} la largeur de l'électrode et $N' = N + 1$ où N est le nombre d'électrodes actionnées pour la création de goutte.

En utilisant l'équation (2.6) et en menant des expériences de création de goutte, les auteurs ont définis un critère concernant le rapport d'aspect du système d/L_{ewod} . Dans l'huile, les opérations fluidiques sont plus aisées du fait de la plus faible valeur de γ ($\sim 47 \text{ mN/m}$) et l'on peut employer un système de rapport d'aspect maximum d/L_{ewod} égal à 1. Dans l'air, condition utilisée dans nos travaux, la scission et la création de goutte sont favorables pour $d/L_{ewod} < 0,4$. Ces considérations permettent d'esquisser les premières contraintes géométriques du système. La distance séparant le capot et la base (d) est fixé à $200\mu\text{m}$. De ce fait, les électrodes d'EWOD auront une largeur supérieure à $500\mu\text{m}$. Les paramètres du diélectrique seront les mêmes que ceux utilisés dans les travaux de Nicolas Verplanck [Verplanck, 2007] et Florian Lapierre [Lapierre, 2011]. Enfin, une importante surface d'électrode au niveau du réservoir permet d'augmenter la force d'électromouillage durant l'étape de pompage du liquide permettant de casser le doigt de liquide. Par conséquent, une surface de réservoir grande facilite l'étape de création de goutte.

2.2.5 Quelques applications EWOD pour les laboratoires sur puce et la microfluidique

La microfluidique digitale (DMF) est une technologie de plus en plus populaire pour de vastes champs d'applications, notamment en biologie [Jebrail & Wheeler, 2010]. L'avantage de cette technique, que l'on compare généralement à la microfluidique continue, ne nécessite pas de pompes ou de valves, éléments complexes, difficiles et coûteux à intégrer dans des systèmes microniques.

En DMF, les échantillons sont manipulés, non pas dans des micro-canaux, mais dans des microgouttes. Ces gouttes peuvent subir de nombreuses opérations de manipulation (création, déplacement, fusion, scission). Les volumes varient du nanolitre au millilitre [Abdelgawad et al., 2008] et peuvent être déplacés sur des substrats peu conventionnels (cf. figure 2.8), aux topologies variées [Abdelgawad et al., 2008, Fan et al., 2010].

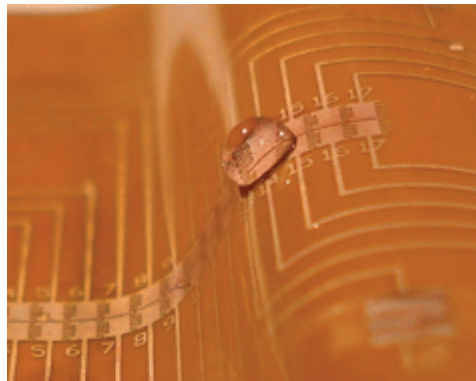


Figure 2.8 : EWOD « tout-terrain » sur substrat souple [Abdelgawad et al., 2008].

Il existe des plateformes de microfluidique complètes, dédiées au diagnostic au chevet du patient (Point of care testing : POCT) [Sista et al., 2008]. Celles-ci sont néanmoins encore au stade de recherche puisqu'elles n'ont pas encore trouvé de réel marché pour leur commercialisation. Il s'agit d'outils portables capables d'effectuer de nombreux tests, rapidement avec le volume d'échantillon le plus faible possible. Ainsi, Sista et al. ont fabriqué un système portable complet permettant des analyses immunologiques ou enzymatiques à partir d'une goutte de sang (cf. figure 2.9). La préparation de l'échantillon, l'amplification par PCR et la détection sont intégrées.

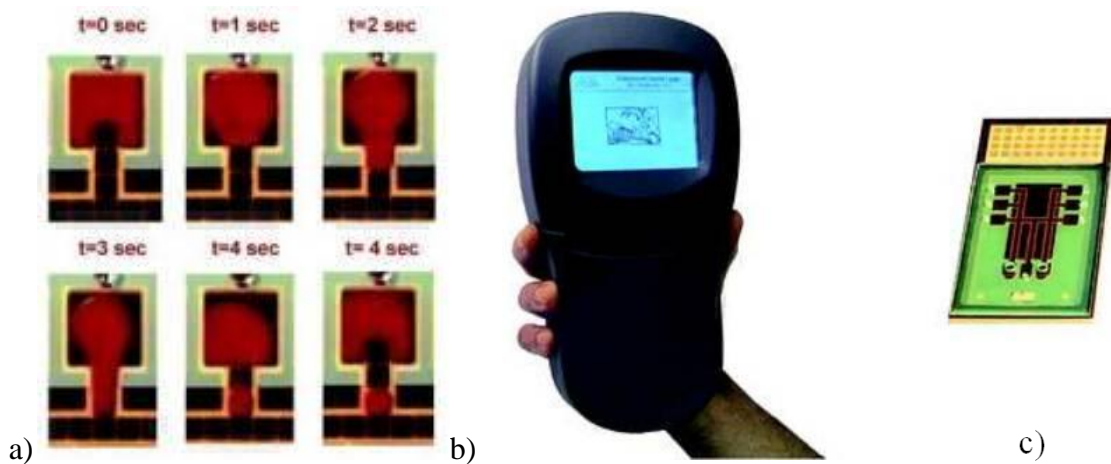


Figure 2.9 : [Sista et al., 2008] a) Dispense de goutte de sang à partir d'un réservoir. b) photo du dispositif portable c) cartouche microfluidique (taille de la cartouche 3.04cm * 6.09cm).

Hua et al. ont développé un système de PCR multiplexée en temps réel basé sur l'électromouillage [Hua et al., 2010]. Leur dispositif, de la taille d'une boîte à chaussures, se compose de tous les moyens de contrôle et de détection requis pour des expériences d'amplification d'ADN. Plusieurs échantillons d'ADN peuvent être amplifiés et détectés simultanément.

Un système portable de la forme d'un bracelet a été créé pour le transport de goutte par électromouillage [Fan et al., 2010]. Facilement détachable, il est porté par le patient, autour du poignet. Ce système n'est pas encore au point pour faire de la détection, mais la preuve du transport de goutte sur ce type de système non plan est établie.

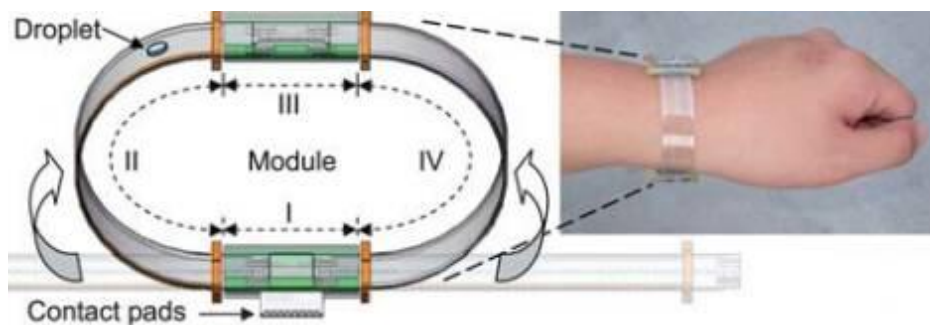


Figure 2.10 : Bracelet intégrant la technologie de déplacement de goutte par électromouillage, pour les applications de POCT [Fan et al., 2010].

La spectrométrie de masse est une technique majeure de la biologie. Intégrée à ce type de puce, les potentialités sont élargies. L'intégration d'une surface nanostructurée à un système de déplacement de goutte par électromouillage a permis la détection de peptides de poids moléculaire faible (700m/Z) avec une sensibilité accrue (inférieure à $10 \text{ fmol } \mu\text{L}^{-1}$) [Lapierre et al., 2011].

La DMF peut également être utilisée dans le domaine de l'environnement. Un système de nettoyage de bio-particules a été étudié dans le cadre d'un projet de contrôle de l'air [Jonsson-Niedziolka et al., 2011]. Des particules telles que des spores ou des virus ont été collectées sur des surfaces hydrophobes et superhydrophobes par moyen électrostatique. Ces substrats ont été nettoyés par le déplacement d'une goutte de liquide déplacée par EWOD. L'efficacité de collecte de particule par cette technique est supérieure à 90% pour les surfaces superhydrophobes.

L'électromouillage est également utilisé dans des systèmes de microfluidique continue constitués de micro canaux, par exemple pour améliorer la génération de goutte d'analytes, c'est-à-dire la préparation de l'échantillon [Gu et al., 2008].

Enfin, des valves dédiées à la microfluidique continue sont développées sur la base de la technique EWOD [Sato et al., 2008]. Elles sont remarquables de par leur simplicité de fabrication et d'intégration, et par leur faible consommation. Ainsi, elle ouvre des perspectives intéressantes pour la construction de système microfluidiques capables de manipuler des liquides dans des configurations complexes.

2.3 Manipulations de microparticules en milieu liquide

Parmi les nombreuses applications de l'électromouillage, on trouve des développements dédiés à la biologie et à la santé. Dans ces domaines, la préparation de l'échantillon est une étape de base très importante. Pour le développement des laboratoires sur puce, l'intégration de cette étape passe par l'utilisation de moyens techniques capables de manipuler des objets biologiques, tels que cellules, bactéries, parasites et virus ou inorganiques tels que nanofils, nanotubes de carbone ou nanoparticules¹⁰.

Dans cette partie, nous présentons des techniques de manipulations de micro objets. Dans un premier temps, nous exposons le principe que nous nommons 'force-vitesse' sur lequel repose la manipulation de microparticules en milieu liquide. Nous faisons un état des lieux des différentes forces employées pour la manipulation d'objets en microfluidique, avec un développement particulier concernant la force diélectrophorétique.

La diélectrophorèse, technique basée sur le gradient non uniforme d'un champ électrique, est très populaire car très adaptée à ces problématiques. Son principe repose sur le domaine de l'ingénierie électrique. Elle est donc facilement intégrable dans des systèmes complexes. Quelques techniques optiques, magnétiques et mécaniques sont également listées.

Enfin, nous montrons quelques exemples de techniques qui utilisent les mouvements de fluide et celles qui combinent l'action d'une force sur la microparticule et sur le liquide.

¹⁰ Des expériences de concentration et de séparation ont été effectuées sur des particules inorganiques tels des nanofils de silicium ou des nanotubes de carbone [Rajaraman et al., 2006, Zhang et al., 2009].

2.3.1 Principe Force-Vitesse

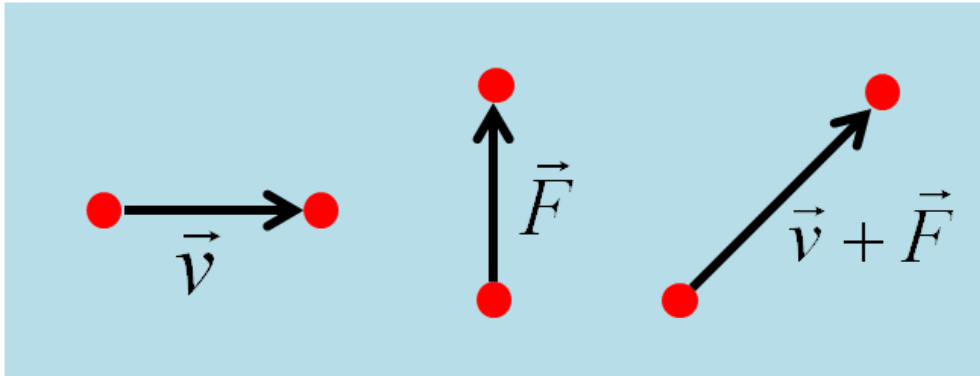


Figure 2.11 : Schématisation du principe \vec{F} , \vec{v} . Une microparticule (en rouge) en suspension dans un liquide peut être manipulée grâce à la vitesse du fluide, à une (des) force(s) extérieure(s) ou la combinaison des deux.

Pour manipuler une microparticule en suspension dans un liquide, il est possible d'exercer directement une force sur la microparticule ou de créer des courants de liquide capables de la mettre en mouvement.

Les forces pouvant agir sur la particule sont de natures électriques, optiques, magnétiques ou mécaniques. La force communément employée pour la manipulation de micro-objets en microfluidique est la diélectrophorèse.

De même, il est possible de créer des mouvements liquides de manières variées comme par l'application d'un gradient de pression, d'un champ électrique, d'ondes lumineuses ou acoustique.

2.3.2 Les techniques de manipulation employant l'action sur la particule.

2.3.2.1 La diélectrophorèse

En 1971, le professeur Herbert A. Pohl [Pohl & Crane, 1971] manipule pour la première fois des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) grâce à la génération d'un champ électrique non uniforme par deux pointes métalliques. Il établit le lien entre le rassemblement des levures et la fréquence du signal, la conductivité du milieu, l'amplitude et l'uniformité du champ électrique.

La diélectrophorèse (DEP) est largement utilisée dans les systèmes microfluidiques car c'est une technique très polyvalente. Elle permet de transporter, d'accumuler, de séparer et de caractériser des entités à l'échelle micro et nanométrique [Khoshmanesh et al., 2011]. Elle ne nécessite pas de marquage moléculaire. Sur les dix dernières années, plus de 2 000 publications traitent de la diélectrophorèse [Pethig, 2010].

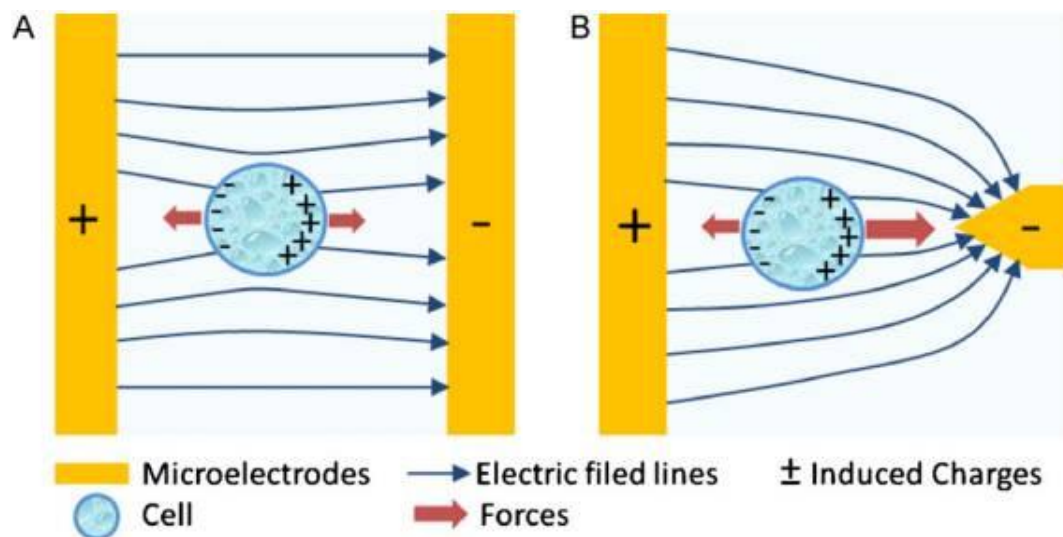


Figure 2.12 : Réponse d'une particule polarisée par un champ uniforme (A) et non uniforme (B). En supposant que la particule est plus polarisable que le milieu environnant, il y a accumulation de charges à l'intérieur de la particule. Dans le cas (B), la particule subit une force nette non nulle et est repoussée vers la zone de champ fort [Khoshmanesh et al., 2011].

Il existe une large variété de systèmes capables de produire un champ électrique non uniforme. Seuls certains d'entre eux sont présentés ici. Pour tout complément d'informations, le lecteur peut se référer à l'article de Kashayar Khoshmanesh [Khoshmanesh et al., 2011] présentant un état de l'art complet des différentes plateformes microfluidiques destinées à diverses applications biomédicales.

Un des intérêts prometteurs apporté par les laboratoires sur puce est la possibilité de travailler sur des cellules uniques [El-Ali et al., 2006, Dittrich & Manz, 2006]. En isolant une seule cellule, il est possible d'en mesurer les caractéristiques et les réponses à un stimulus en s'affranchissant de l'effet de dilution du signal lors d'analyses sur des populations. La capture et l'isolation d'une seule cellule est une problématique à laquelle la diélectrophorèse peut répondre efficacement. Ainsi, des cellules uniques peuvent être disposées et triées sur un réseau d'électrodes jouant le rôle de piège [Taff & Voldman, 2005]. Urdenata et al. ont fabriqué des pièges réversibles, où la cellule piégée peut être libérée [Urdeneta & Smela, 2008]. La diélectrophorèse négative, n-DEP, peut être utilisée afin de capturer une seule cellule en lévitation dans un micro-puits [Bocchi et al., 2009]. Aussi, avec un système d'électrodes adapté, la n-DEP autorise la capture de cellules dans des milieux très conducteurs, à l'image des milieux physiologiques [Thomas et al., 2009].

L'une des forces de cette technique est qu'elle est électrique. De ce fait, les systèmes de diélectrophorèse sont facilement parallélisés et programmables. Un prototype basé sur la technologie CMOS a été fabriqué pour la manipulation, la détection et le tri de cellules vivantes sur une matrice adressable [Manaresi et al., 2003, Medoro et al., 2003, Medoro et al., 2007]. De même, Hunt et al. ont réalisé une puce de capture de cellules vivantes capable de les déplacer selon un chemin préprogrammé [Hunt et al., 2008] (cf. figure 2.13).

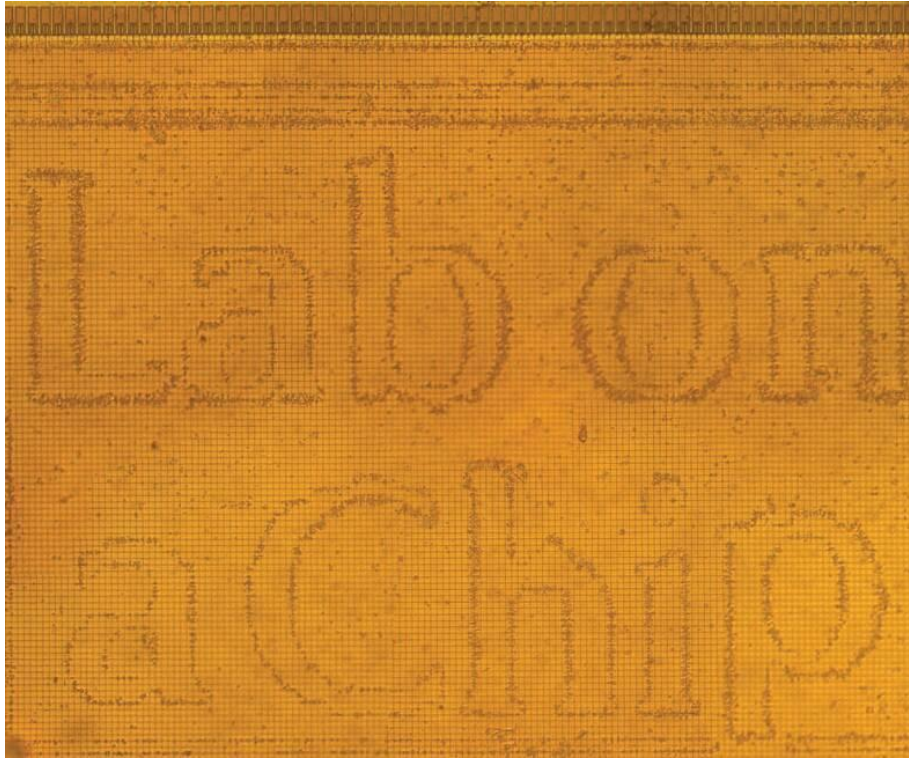


Figure 2.13 : Cellules vivantes capturées par DEP et contrôlées sur une puce de 128*256 pixels de $11\mu\text{m}^2$ [Hunt et al., 2008]. Chaque pixel composant le mot 'lab on a chip' est constitué d'une cellule biologique.

Dans la technique de la tw-DEP (travelling wave dielectrophoresis), un champ ondulatoire AC est généré par l'application d'une excitation en quadrature de phase (0° , 90° , 180° et 270°) sur une suite d'électrodes. La DEP est proportionnelle à la partie réelle du facteur de Clausius Mossotti. L'orientation de la force DEP (positive ou négative) dépend du signe de ce facteur. Dans les bonnes conditions de conductivité électrique et de permittivité du milieu et de la particule, les particules subissent la nDEP et lèvitent. Elles sont simultanément emportées par une force tw-DEP, proportionnelle à la partie imaginaire du facteur de Clausius Mossotti, qui les emporte parallèlement au substrat [Cen et al., 2004, Zhao et al., 2007, Cheng et al., 2009]. Higginbotham et al. ont combiné ce système avec une détection par spectroscopie d'impédance pour mesurer la concentration de cellules en suspension [Higginbotham & Sweatman, 2008]. Lei et al. ont utilisé cette technique pour la création d'une pompe capable de distribuer du sang dans un système microfluidique [Lei et al., 2009b].

Enfin, la diélectrophorèse apporte également des solutions pour la parasitologie, sujet qui nous intéresse particulièrement. Les travaux de Gascoyne ont démontré l'isolation de globules infectés par le parasite de la malaria à partir d'échantillons sanguins [Gascoyne et al., 2002]. De même, le parasite *Cryptosporidium parvum* a fait l'objet de deux travaux en rapport avec cette technique électrique qui proposent un moyen de concentrer le parasite par DEP et d'investiguer sa viabilité par électrorotation [Goater et al., 1997, Brown & Betts, 2001].

2.3.2.2 Quelques autres forces

La lumière exerce une force sur la matière, une pression de radiation. Des particules diélectriques peuvent être attirées et piégées dans le faisceau d'un laser. Une particule hors du faisceau d'un laser est exposée à une force qui la repousse dans le faisceau si la particule est transparente, ou qui l'éloigne du faisceau si la particule est opaque. De plus la particule interagit avec le gradient de lumière de la même manière que dans un dispositif diélectrophorétique, causant son éloignement ou son rapprochement des hauts gradients de champ. Les pinces optiques sont des dispositifs photoniques qui exploitent ce phénomène à l'aide d'un faisceau laser très ciblé pour manipuler les particules diélectriques en trois dimensions de manière non invasive. Elles peuvent être employées au sein d'un système microfluidique pour déplacer et trier des cellules sans déplacement de fluide [Enger et al., 2004].

Grâce à un champ magnétique et l'intégration d'éléments magnétiques fabriqués par lithographie, il est possible de transporter des quantités très faibles de protéines (attomole), immobilisées sur des microbilles magnétiques, sur des distances micrométriques dans un laboratoire sur puce [Johansson et al., 2010].

Enfin, Jung et al. ont proposé une technique de concentration et de séparation de microparticules et de cellules biologiques basée sur les forces mécaniques générées par l'évaporation de goutte [Jung & Kwak, 2007].

2.3.3 Techniques de manipulation employant l'action du liquide

La technique de REP (Rapid Electrokinetic Patterning), introduite par Williams et al. [Williams et al., 2008], est capable de rassembler des microparticules en créant des courants de fluide grâce à un laser (cf. figure 2.14). Le système se compose d'un échantillon liquide contenant les particules, encapsulé entre deux électrodes d'ITO (Indium Tin Oxyde). L'excitation optique génère des courants fluidiques importants autour du point d'illumination. Les particules se rassemblent en prenant la forme géométrique du dessin projeté. Ces mouvements de liquide seraient dus à de forts gradients de température créés sur la surface illuminée [Kumar et al., 2010]. Cette technique fonctionne également avec des électrodes en or [Williams et al., 2010].

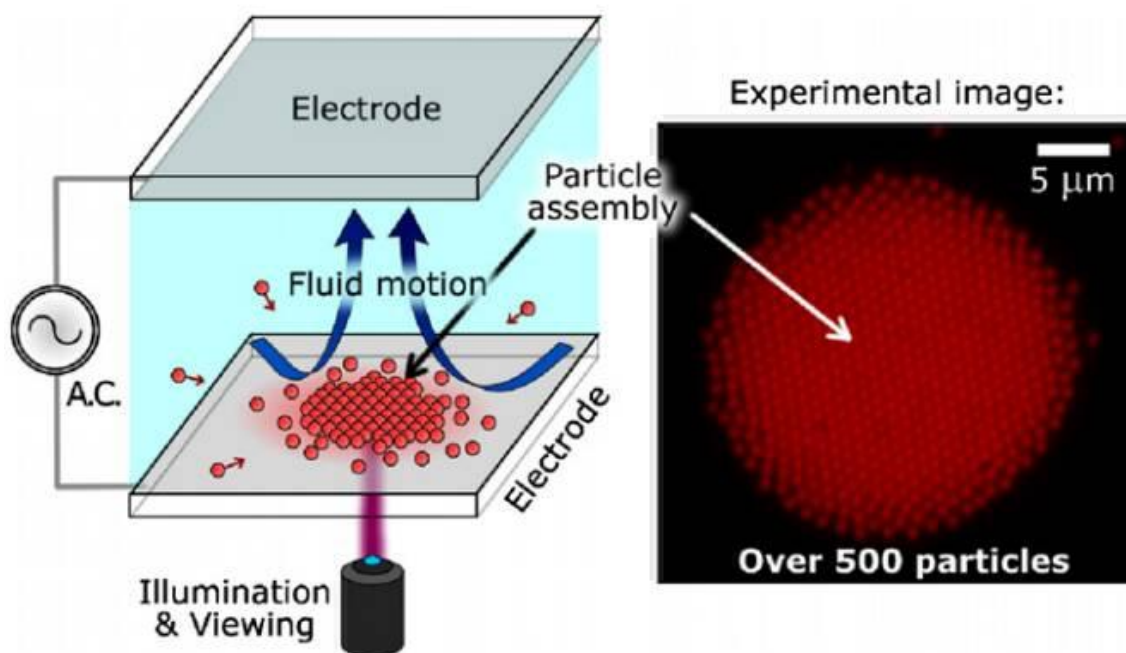


Figure 2.14 : Principe du REP (Rapid Electrokinetic Patterning). Des mécanismes électrocinétiques sont induits par une excitation optique et permettent de concentrer des particules (diamètre 1µm, concentration de plus de 500 particules) [Williams et al., 2010].

Les ondes acoustiques de surfaces (SAW) sont également un moyen de générer des courants de fluide au sein d'une goutte et de concentrer des microparticules (cf. figure 2.15). Une onde électroacoustique se propage sur la surface d'un cristal piézo-électrique qui se déforme sous l'action d'un champ électrique. Le champ électrique nécessaire est créé à l'aide de transducteurs interdigités métalliques (IDT) qui sont déposés sur la surface du cristal. Lorsqu'une goutte est placée sur le substrat sur le chemin de l'onde SAW, une partie de la composante longitudinale de l'onde est réfractée dans le milieu liquide. Cette énergie réfractée est responsable de courants de fluide lorsqu'elle a atteint une intensité suffisante pour induire des effets de compressibilité dans le fluide.

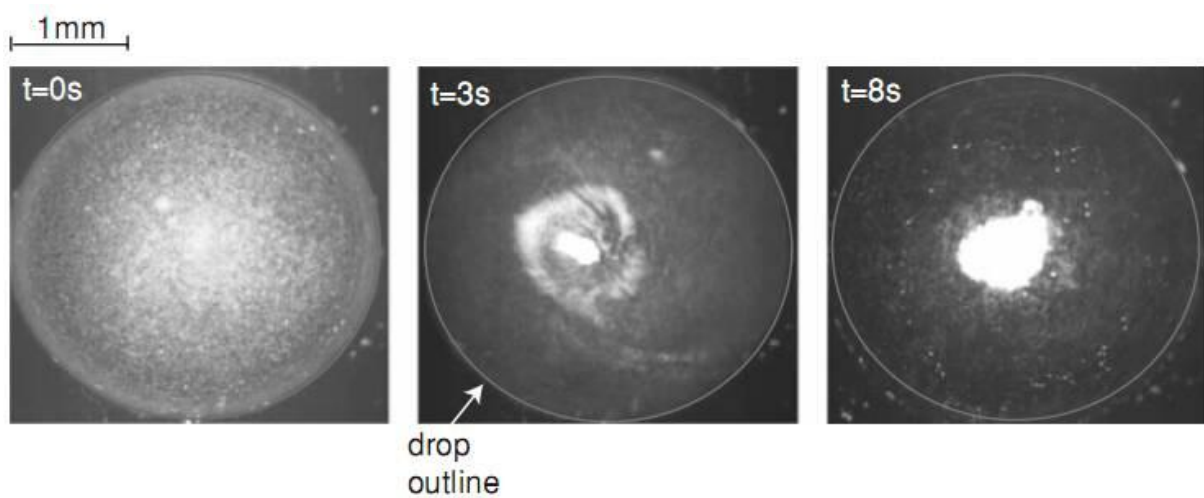


Figure 2.15 : Concentration de particules de 5µm de diamètre par ondes acoustiques de surface [Raghavan et al., 2010].

2.3.4 Techniques combinant la force exercée sur la microparticule et le déplacement du liquide

La technique la plus commune est l'utilisation de la diélectrophorèse dans un système de microfluidique continue où le liquide se déplace dans des microcanaux. Il est constitué d'un réseau d'électrodes planaires inter-digitées (peignes inter-digités) qui tapisse le fond du canal. Ces systèmes peuvent réaliser le tri de bactéries vivantes et mortes [Li & Bashir, 2002], la séparation de cellules et de billes de latex de différentes tailles [Rousselet et al., 1998], ou encore la concentration efficace de bactéries sur la surface d'électrodes par le couplage de la DEP et de l'immuno-capture [Yang et al., 2006]. Le réseau d'électrode parallèle est également utilisé pour le positionnement précis de particules en vue d'analyses optiques sophistiquées [Yantzi et al., 2007], ou plus original, pour la création de motifs de culture de cellules de différents types [Suzuki et al., 2008]. Lagally et al. ont piégé et concentré des cellules par DEP en vue d'une analyse génétique de séquences d'ADN spécifiques (*E. Coli*) [Lagally et al., 2005].

D'autres exemples originaux d'utilisation de la diélectrophorèse sont la L-DEP (latéral DEP) et la E-DEP (Electrodeless DEP). Dans le cas de la L-DEP, la non-uniformité du gradient de champ électrique est créée depuis le bord du canal. Dans un système de E-DEP, le gradient de champ est généré par la présence de plots isolants entre deux électrodes. Il existe des systèmes nommés C-DEP pour contactless DEP (Diélectrophorèse sans contact) (cf. figure 2.16), qui combinent la L-DEP et la E-DEP.

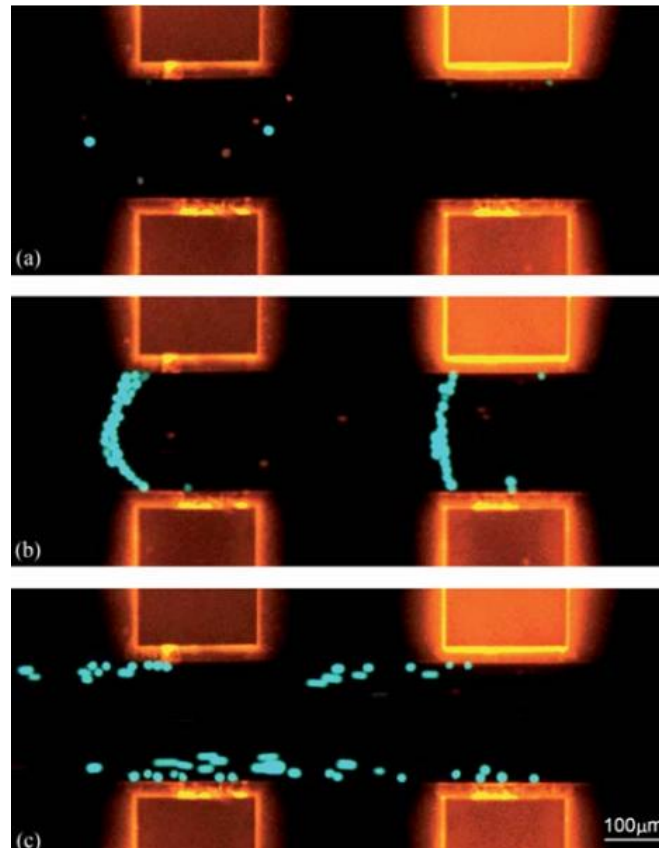


Figure 2.16 : Les résultats expérimentaux d'un système C-DEP: (a) les cellules THP-1 mortes (rouge) et vivantes (bleu/vert) se déplacent de droite à gauche à cause de la pression du flux sans appliquer un champ électrique. (b) 30 s après l'application du champ électrique, les cellules vivantes (bleu / vert) ont été piégées par la DEP positive, mais les cellules mortes (rouge) passent par la zone de piégeage. (c) Libération des cellules vivantes piégées par coupure de l'alimentation. Les canaux secondaires sont fluorescents à cause du colorant rhodamine B en suspension dans le PBS [Shafiee et al., 2010].

La diélectrophorèse latérale utilisant des électrodes liquides, a permis de trier des cellules en flux continue [Braschler et al., 2008, Demierre et al., 2007, Wang et al., 2007a], et couplée à un système de lyse [Mernier et al., 2010]. Des systèmes intégrant la diélectrophorèse sans électrode font le tri de bactéries et séparent les morts des vivants grâce aux différences de propriétés diélectriques [Lapizco-Encinas et al., 2004, Lapizco-Encinas et al., 2005, Chou & Zenhausern, 2003].

La diélectrophorèse est également utilisée pour guider des cellules dans des systèmes de microfluidique continue sans présence de canaux physiques [Fiedler et al., 1998]. En exploitant ce principe, Moon et al. ont séparé des cellules cancéreuses (du sein) de globules rouges du sang [Moon et al., 2011]. Flores et al. ont créé des lignes étroites de billes de latex dans un canal en restreignant le flux de particules grâce aux forces diélectrophorétiques (cf. figure 2.17). Cette étape est utilisée pour la construction de matériaux micro-structurés [Flores-Rodriguez & Markx, 2006].

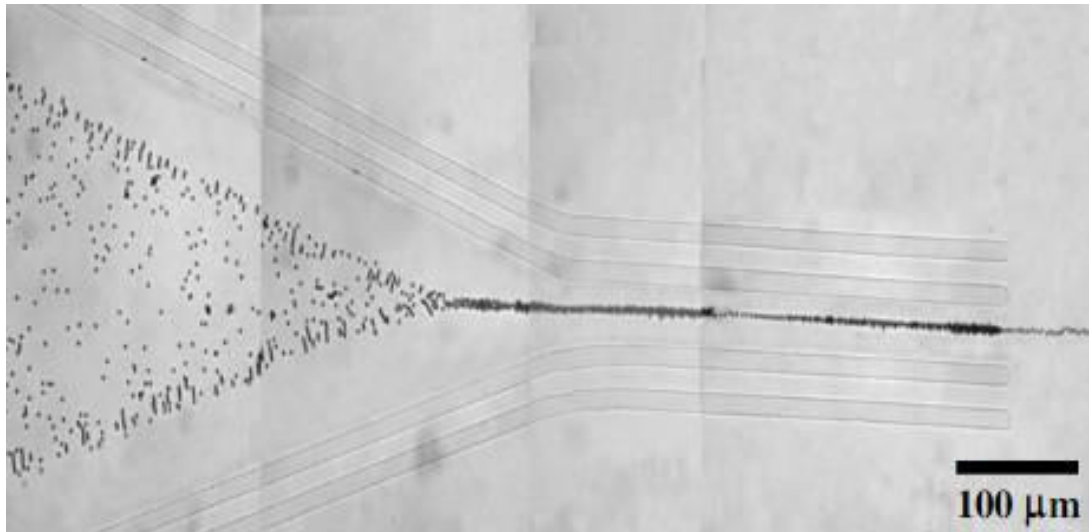


Figure 2.17 : Création d'une ligne de billes de latex en faisant converger le faisceau de particules par diélectrophorèse [Flores-Rodriguez & Markx, 2006].

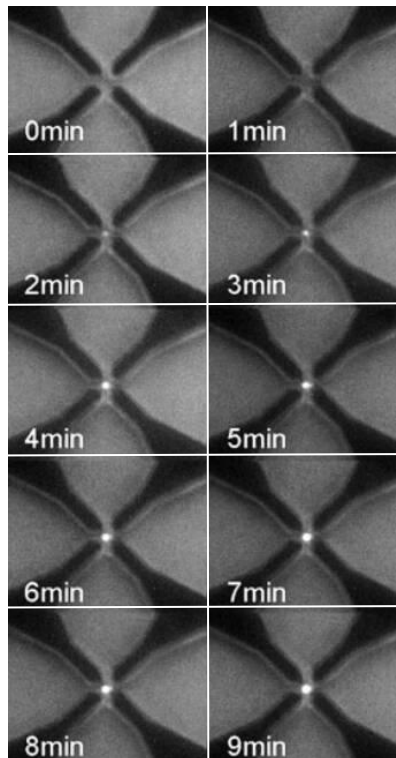


Figure 2.18 : Accumulation du virus de l'hépatite A au centre d'un système d'électrode quadripolaire [Grom et al., 2006].

L'utilisation d'effets électrocinétiques supplémentaires tels que l'électroosmose (EOO) ou l'électrothermique AC (ACET) permet d'améliorer la capacité de collecte et de concentration de particules nano-micrométriques ou d'ADN [Bhatt et al., 2005, Sin et al., 2009, Lei et al., 2009a, Krishnan & Heller, 2009]. Des virus (par exemple le virus de l'hépatite A) ont été collectés dans des zones prévues d'un système quadripolaire par la combinaison de la diélectrophorèse et des effets électrohydrodynamiques (cf. figure 2.18) [Grom et al., 2006, Docoslis et al., 2007]. Ce même système d'électrode quadripolaire a été utilisé pour la séparation de levures vivantes et mortes par DEP, améliorée par une fonctionnalisation chimique de la population de morts par du glutaraldéhyde.

La technique de pince optique a été intégrée dans un système de microfluidique continue [Wang et al., 2011]. Il combine la manipulation optique de cellules uniques au déplacement de liquide dans un canal principal afin de piéger et trier plusieurs types de cellules en parallèle (cf. figure 2.19).

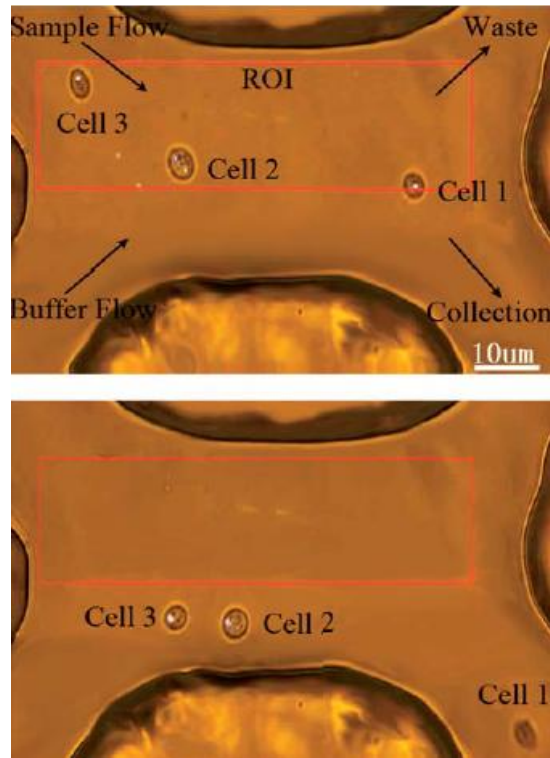


Figure 2.19 : Tri parallèle par multi-piégeage (le spot lumineux piège la cellule). La zone comprise dans le rectangle rouge est la zone d'action du piège [Wang et al., 2011].

Le champ magnétique a été exploité de façon remarquable dans un système de séparation immuno-magnétique pour la séparation et la détection d'agents pathogènes de l'eau [Ramadan et al., 2010]. Ce système microfluidique sépare les parasites du genre *Cryptosporidium*, initialement fonctionnalisés par un marqueur magnétique, grâce à un réseau d'aimants tournants (cf. figure 2.20). Des phases alternées de capture et de libération dans le canal autorisent le lavage de l'échantillon par le fluide circulant. Ainsi, en sortie du système, les échantillons collectés sont très purs. Ce système de séparation automatique peut être une alternative aux méthodes 1622 et 1623 de l'USEPA [USEPA, 2005], qui nécessitent des interventions humaines sources d'erreurs.

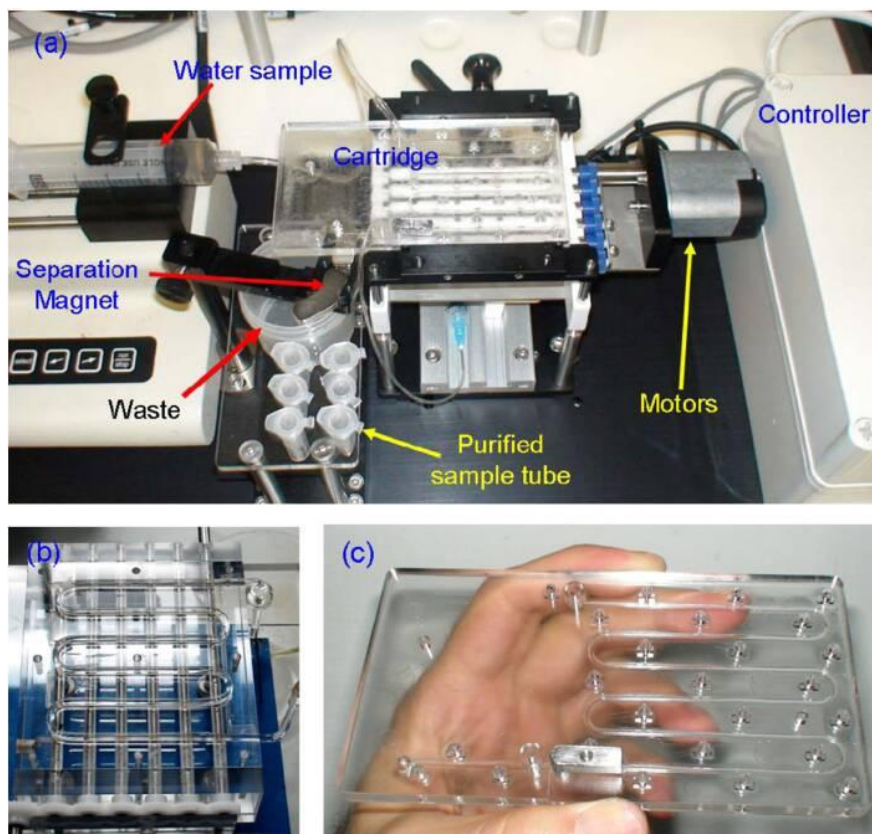


Figure 2.20 : Images de la mise en place du système de séparation magnétique [Ramadan et al., 2010]. (a) : système complet (b) : canaux en verre (c) : cartouche.

2.4 Techniques de concentration mettant en jeu l'EWOD

Nous présentons dans ce paragraphe quelques techniques de concentration de particules dans des systèmes de microfluidique discrète utilisant l'électromouillage. L'objectif est de rassembler les particules sur un bord de la goutte, puis de couper la goutte par électromouillage.

2.4.1 EWOD et manipulation magnétique

Wang et al. ont proposé un système de concentration de particules magnétiques [Wang et al., 2007b]. Le système est en configuration 2D, les gouttes de liquide aqueux étant entourées d'air. La base et le capot sont séparés par un gap de 70 μ m. Un aimant permanent placé sur le capot attire les billes magnétiques dans un coin de la goutte (cf. figure 2.21). A l'issue de l'étape de scission de goutte par électromouillage, 92% des billes magnétiques sont récoltées dans la goutte fille. Dans le cas d'une séparation entre billes magnétiques et non magnétiques, un protocole spécifique permet d'obtenir un taux de récupération des billes magnétiques de 94% dans une goutte et un taux de billes non magnétiques de 92% dans l'autre.

Les forces interfaciales dans les microsystèmes fluidiques en goutte sont dominantes. Les auteurs de l'équipe de 'CJ' Kim proposent une méthode de concentration et de séparation de billes magnétiques améliorée par l'utilisation des forces interfaciales au niveau du ménisque de la goutte [Shah & Kim, 2009]. Ces forces ratissent les particules restées en surface, qui n'ont pu être attirées par l'aimant. Une amélioration significative (77% à 99%) de la collecte de particules a été observée. L'électromouillage peut se faire dans l'air ou dans l'huile, la hauteur de goutte étant de 100 μ m.

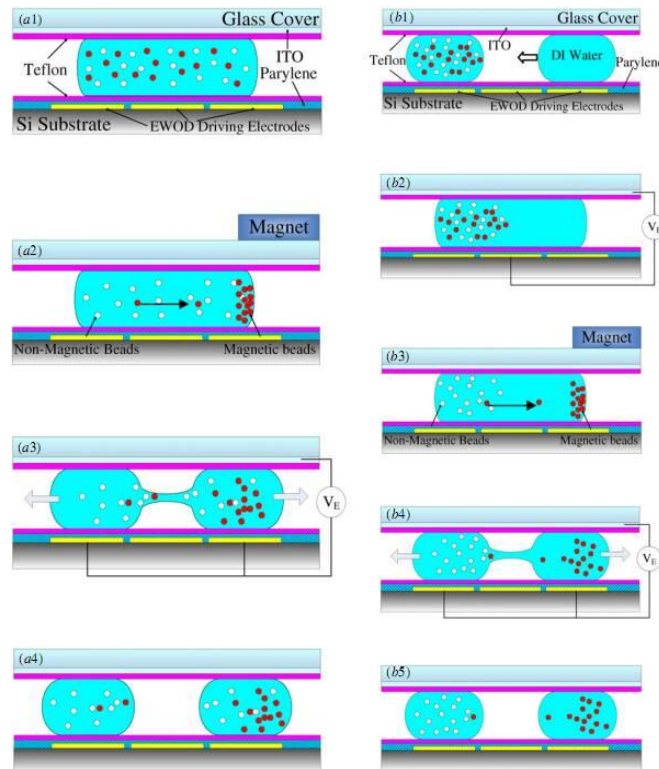


Figure 2.21 : Concentration et séparation de particules magnétiques (en rouge) parmi des particules non magnétiques [Wang et al., 2007b]. Deux schémas de séparation de particules magnétiques dans les gouttes. (Schéma 1) : (a1) Un mélange de gouttes contenant des particules magnétiques et non magnétiques est placé entre deux plaques parallèles ; (a2) sous un champ magnétique généré par l'aimant permanent, les particules magnétiques (en rouge) sont transportées et concentrées sur le côté droit ; (a3) sous électromouillage sur diélectrique (EWOD), la force générée par deux électrodes, la goutte est divisée en deux gouttes filles ; (a4) enfin les particules magnétiques sont concentrées dans la goutte fille à droite tandis que les particules non-magnétiques sont présentes dans les deux gouttes filles. (Schéma 2) : (b1) Une goutte contenant un mélange de particules magnétiques et non magnétiques et une goutte d'eau pure désionisée sont placées côte à côte entre deux plaques parallèles ; (b2) sous la force EWOD, les gouttes sont fusionnées en une seule goutte; (b3) sous un champ magnétique, les particules magnétiques (en rouge) sont transportées et concentrées sur le côté droit ; (b4) sous la force EWOD, la goutte est divisée en deux gouttes filles ; (b5), enfin la goutte de droite est riche en particules magnétiques, tandis que celle de gauche est riche en particules non-magnétiques.

Les auteurs rappellent que malgré les avantages apportés par l'utilisation d'huile en tant que fluide environnant la goutte (elle diminue fortement l'hystérésis de l'angle de contact et la tension interfaciale, facilitant ainsi les opérations EWOD), il existe une liste de nombreux inconvénients :

1. Il peut y avoir de l'absorption de protéines au niveau de l'interface liquide/huile, engendrant des pertes qui peuvent être rédhibitoires pour la détection.
2. La fine couche d'huile existant entre la surface et l'échantillon interdit toute fonctionnalisation de surface, et peut diminuer les performances des détecteurs qu'elle peut intégrer.
3. Les échanges gazeux sont plus difficiles, ce qui peut être très nocifs pour des échantillons vivants.
4. Le packaging du système est plus complexe du fait du risque de fuite.

Les billes paramagnétiques sont largement utilisées lors d'essais biologiques et cliniques pour la capture et l'immobilisation de cibles d'intérêts tels que les ADN, ARN, cellules ou antigènes et anticorps spécifiques. Une puce, plateforme de microfluidique discrète EWOD, dédiée à l'analyse par PCR en temps réel a été développée par l'équipe de Pollack [Hua et al., 2010]. L'EWOD se fait dans l'huile, le gap entre les deux substrats est de $275\mu\text{m}$. La puce contient un système de préparation de l'échantillon à partir de billes paramagnétiques. La capacité de concentration du système peut autoriser l'analyse d'échantillons d'agents pathogènes qui peuvent parfois être en faible concentration dans les spécimens cliniques.

2.4.2 EWOD et manipulation optique

La technique d'électromouillage peut être parfaitement couplée aux techniques de manipulations optiques. Sha et al. ont démontré l'intégration de pinces optoélectroniques au sein d'un système EWOD pour la collecte de cellules Hela [Shah et al., 2009]. La technique des pinces optoélectroniques combine les avantages des pinces optiques et de la diélectrophorèse. La distribution du champ électrique dans la goutte est contrôlée optiquement, comme si elle était créée par des électrodes lumineuses.

Valley et ses collègues ont employé les pinces optoélectroniques pour la manipulation des particules, et les ont introduites dans un système d'Opto-électromouillage (OEW : Opto ElectroWetting) [Valley et al., 2011]. La mouillabilité de la surface est modifiée par une excitation optique (cf. figure 2.22).

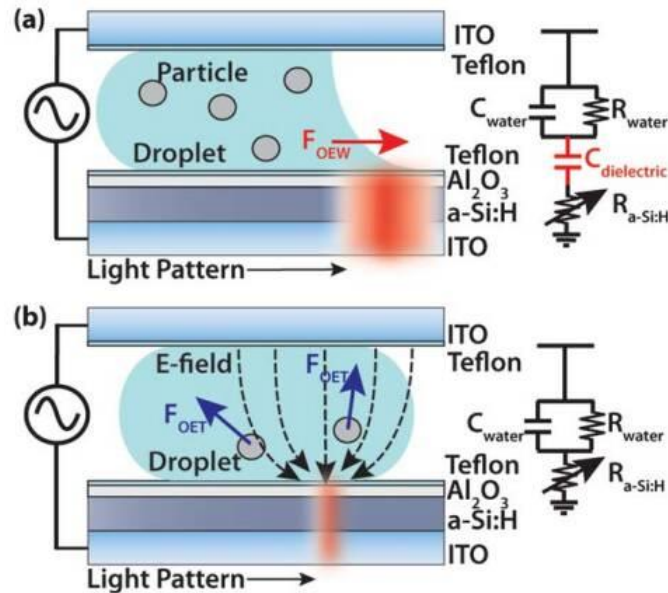


Figure 2.22 : Schéma du système de Valley et al. [Valley et al., 2011]. a) Mode OEW (OptoElectroWetting) ($f < 100 \text{ kHz}$) : la lumière incidente interagit avec la couche photoconductrice a-Si:H et concentre localement le champ électrique à travers une mince couche diélectrique de Al_2O_3 et de téflon. Le phénomène d'électromouillage est induit par l'excitation lumineuse de la surface. b) Schéma du dispositif fonctionnant en mode OET (OptoElectronic Tweezers) ($f > 100 \text{ kHz}$). Dans ce cas, les couches électriquement isolantes Al_2O_3 et téflon sont court-circuitées et le champ est maintenant concentré dans la goutte. Par conséquent, les particules subissent une force DEP lorsqu'elles se trouvent dans le voisinage de l'énergie optique incidente. Dans ce régime, l'appareil est électriquement identique aux pinces optoélectroniques standards.

2.4.3 EWOD et manipulation électrique

Les méthodes magnétiques et optiques ont l'avantage de procurer de bons résultats de concentration et séparation (au-delà de 90% des particules collectées). Cependant, leur mise en œuvre est assez complexe. La technique magnétique exige des étapes de chimie de fonctionnalisation des espèces biologiques à analyser avec des billes paramagnétiques, et l'utilisation d'un aimant. La technique optoélectronique demande, dans la plupart des cas, du matériel lourd comme le LASER, ce qui peut entraver le champ d'application de ces systèmes du fait de leur portabilité réduite.

La technique électrique est simple à mettre en œuvre car elle s'intègre facilement à un système programmable d'électromouillage.

Un premier système proposé par Cho et al. a utilisé l'électrophorèse pour rassembler des particules chargées négativement avant de couper la goutte mère en deux gouttes filles [Cho et al., 2007]. Plus de 83% de l'échantillon a été récolté, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration de 73%. Au-delà des résultats quantitatifs, c'est bien le principe de concentration dans un système d'électromouillage qui a été prouvé et validé.

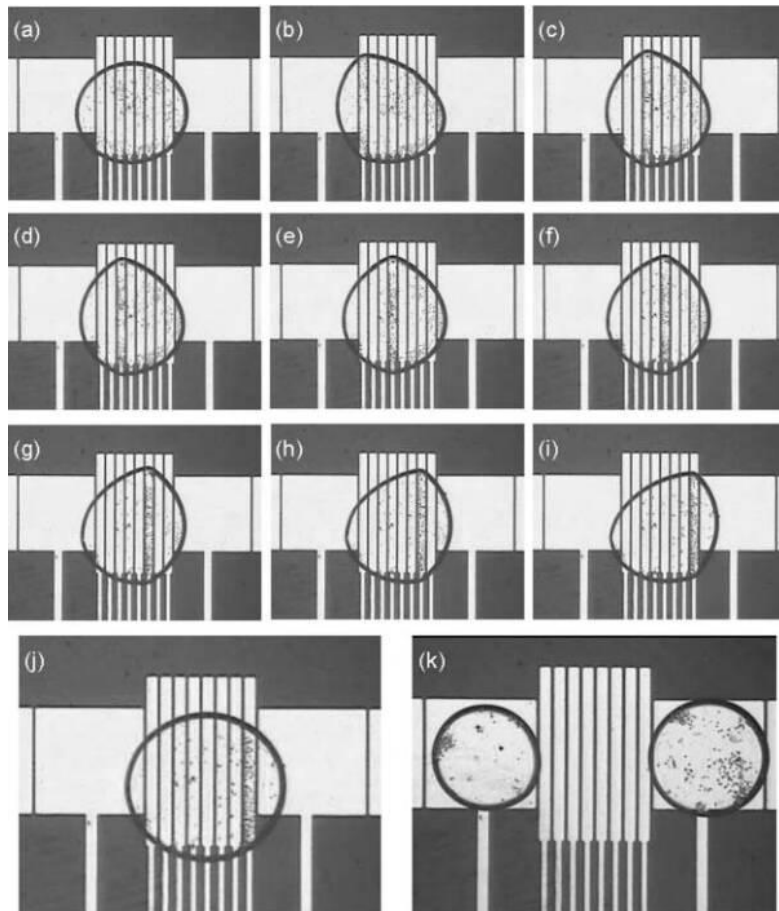


Figure 2.23 : Concentration de cellules par DEP et EWOD [Fan et al., 2008]. (a-j) Les électrodes rectangulaires sont activées séquentiellement pour repousser les particules vers la droite de la goutte. (k) Une fois que les cellules sont rassemblées, la goutte est coupée en deux par électromouillage.

Fan et al. ont intégré un réseau d'électrodes rectangulaires sur un chemin d'électrodes EWOD (cf. figure 2.23) afin de concentrer des cellules par diélectrophorèse et EWOD. Le système est encapsulé dans un environnement d'huile, avec un écart de $200\mu\text{m}$ entre le capot et la base. Après concentration, l'une des gouttes est concentrée 1,6 fois, alors que l'autre est diluée 2,6 fois. La diélectrophorèse est également utile pour la séparation de particules aux paramètres diélectriques différentes. Ainsi, les cellules ont été séparées d'un échantillon de billes de latex, en jouant sur la réponse diélectrophorétique différente des deux types d'entités.

2.4.4 Objectifs du travail de doctorat

Ce travail de doctorat a pour objectif le développement d'un outil type laboratoire sur puce capable :

- de concentrer des microparticules en suspensions dans une goutte,
- d'analyser le pouvoir infectieux d'agents pathogènes,
- de cultiver un tapis cellulaire en microenvironnement.

L'objectif principal visé par ce travail est la mise au point d'un système de concentration de microparticules. Ce système doit être intégré dans un laboratoire sur puce de microfluidique dite discrète. Dans le cadre applicatif de ces travaux, le concentrateur doit fonctionner avec des oocystes de *Cryptosporidium parvum*.

La fonction de concentration est indispensable. Actuellement, les volumes d'échantillons manipulés en tube varient du millilitre à la dizaine de microlitres. Or, les systèmes de type laboratoire sur puce emploient des volumes variant de quelques microlitres à quelques nanolitres. De ce fait, il est nécessaire de créer un outil capable de concentrer à ces échelles volumétriques. De plus, les échantillons issus de prélèvements environnementaux sont peu concentrés en parasites. Enfin, le dispositif de comptage de parasites développé dans l'équipe par le Docteur Houssin est sensible à des concentrations de l'ordre de la centaine d'oocystes par μL [Houssin, 2011]. Cela signifie qu'une étape préliminaire de concentration est nécessaire afin d'entrer dans la gamme de sensibilité du capteur.

Le dispositif se veut le plus simple possible en termes d'intégration, et d'automatisation. Par conséquent, les techniques optiques et magnétiques vues précédemment sont exclues de notre champ de recherche. En effet, les techniques optiques exigent l'emploi de lasers spécifiques difficilement intégrables dans un laboratoire sur puce alors que les techniques magnétiques reposent sur l'utilisation d'aimants et la fonctionnalisation des entités biologiques par des éléments magnétiques.

Le choix du tout électrique est également motivé par le savoir-faire de l'équipe, où il existe une forte expertise au niveau des systèmes de microfluidique discrète basés sur

l'électromouillage (EWOD), ainsi qu'un important effort de recherche sur les méthodes d'analyses électriques (spectroscopie d'impédance et térahertz). Les avantages du tout électrique sont la facilité d'intégration des différents composants de la plateforme d'analyse grâce aux techniques de lithographie et le fort potentiel d'automatisation et de parallélisation du système.

L'objectif est de rassembler les microparticules dans des zones proches du bord de goutte. Pour ce faire, au vue des divers moyens existants, la technique la plus avantageuse en termes de simplicité de mise en œuvre et d'intégration est la diélectrophorèse. C'est une technique électrique qui ne nécessite aucun marquage.

Nous avons présenté précédemment les travaux de Fan et al. [Fan et al., 2008] exposant un système de concentration dans un système EWOD qui utilise la diélectrophorèse au sein d'une goutte de $0.5\mu\text{L}$ (électrodes de $1\text{mm}\times 1\text{mm}$ et hauteur de goutte de $200\mu\text{m}$), coupée en deux gouttes filles. Notre stratégie de développement est sensiblement équivalente à celle employée par Fan et ses collègues. Cependant, nous avons pour objectif d'améliorer l'efficacité de ce type de concentrateur grâce à l'augmentation des tailles de gouttes utilisées, notamment par l'intégration du concentrateur dans un réservoir de surface millimétrique (ayant un volume de plusieurs μL). L'étape de concentration est couplée à la création d'une goutte plus petite que la goutte de départ (d'un volume de plusieurs centaines de nanolitres). Ainsi, le pouvoir concentrateur est amélioré en créant un volume d'échantillon plus faible d'un ordre de grandeur que le volume de départ.

Ces changements de dimensions au niveau du réservoir requièrent une nouvelle conception des électrodes générant le gradient de champ électrique responsable de la diélectrophorèse. De ces changements découlent une étude approfondie des phénomènes électrocinétiques prenant place dans la goutte lorsqu'une excitation électrique y est appliquée (cf. chapitre 3).

2.5 Spécifications du système et résultats préliminaires

L'objectif de ce travail est de pouvoir rassembler et concentrer des particules d'intérêt au sein d'un système de microfluidique digital EWOD. L'EWOD apporte plusieurs contraintes au niveau de la conception du système. En effet, il s'agit de fabriquer des électrodes enterrées sous une couche diélectrique, et recouverte d'un polymère hydrophobe. De plus, le système est encapsulé entre deux plans. La distance entre ces deux plans est limitée car la force motrice d'électromouillage est inversement proportionnelle à celle-ci (cf. équation (2.1)). Dans ce travail, elle a été fixée à $200\mu\text{m}$ (figure 2.24).

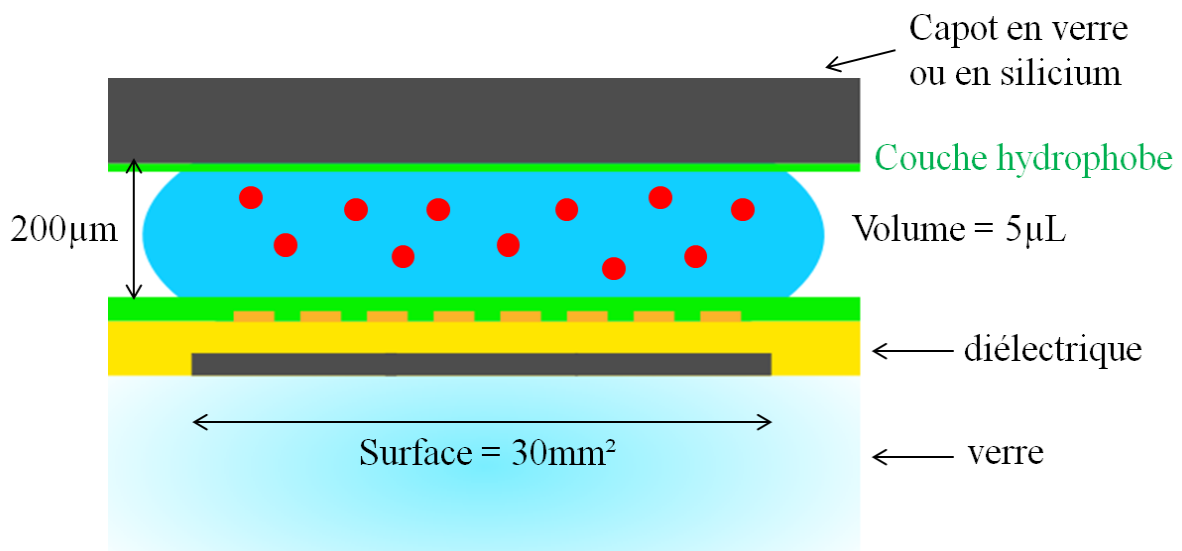


Figure 2.24 : Schéma du réservoir concentrateur de microparticules.

Le liquide utilisé est de l'eau désionisée. Selon les besoins expérimentaux, la conductivité du liquide peut être modulée par l'ajout de sels (KCl). Le volume du concentrateur doit être de quelques microlitres ($5\mu\text{L}$), recouvrant une surface importante afin de faciliter la création de goutte. De plus, classiquement, les étapes de concentration d'échantillon en laboratoire s'effectuent grâce à des centrifugations répétées d'un volume de quelques millilitres ou centaines de microlitres, puis par extraction du surnageant en prenant soin de ne pas aspirer le culot (échantillon utile, à concentrer, présent dans le fond du tube). Cette étape demande beaucoup de savoir-faire, car tout le surnageant doit être retiré tout en gardant le culot intact.

Par contre, il est facile de retirer la plus grande partie du surnageant, et de ne laisser que quelques microlitres au fond du tube afin de ne pas perdre le culot. Par conséquent, si le système est capable de concentrer des échantillons de quelques microlitres, il est un réel atout lors de la dernière étape du procédé de concentration précédemment décrit.

La concentration initiale en billes et parasites utilisée dans le système varie entre 250 et 1 000 particules/ μL . Ce choix est gouverné par deux éléments. Le premier élément est lié aux travaux de thèse de Timothée Houssin (thèse réalisée dans l'équipe) sur la mesure électrique de la concentration de parasites dans de l'eau. Ces travaux mentionnent une gamme de sensibilité de 100 à 1 000 oocystes par microlitre [Houssin, 2011]. Le deuxième élément est extrait de l'étude de Arrowood sur l'infestation de tapis cellulaires *in vitro* par *Cryptosporidium parvum*. Cette étude montre que lors d'infestation *in vitro*, il est recommandé d'inoculer des concentrations de l'ordre de 10^6 oocystes/mL sur des surfaces de tapis cellulaire de quelques cm^2 , ce qui équivaut à des concentrations en oocytes de l'ordre de 1000/ μL [Arrowood, 2002]. Une étude récente de Korbel et al. sur l'infection de *Cryptosporidium parvum* de souriceaux fait état d'une inoculation orale de $5\mu\text{L}$ de solution contenant $2,5 \cdot 10^4$ oocystes [Korbel et al., 2011]. Il a été choisi de conserver ces ordres de grandeur afin de reproduire les conditions idéales d'infestation du parasite *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, afin de s'affranchir des contraintes de fabrication exigées par la technique EWOD, il a été décidé de ne fabriquer que la partie du système dédiée à la concentration des particules. L'idée première a été de fabriquer un système d'électrodes planaires capable de repousser des particules en suspension dans une goutte vers ses bords. Il a été imaginé des géométries d'électrodes capables de générer un gradient de champ électrique assez fort pour manipuler les particules vers les extérieurs du réservoir. La figure 2.25 montre un schéma simplifié du système.

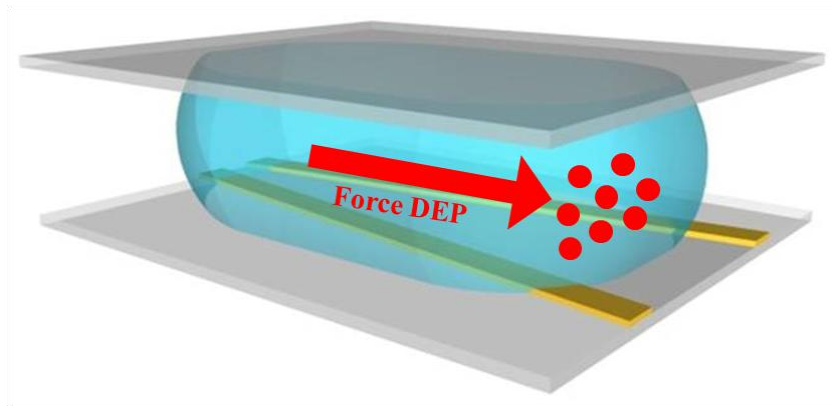


Figure 2.25 : Vue schématique 3D du dispositif de concentration. Des électrodes planaires en or sont disposées sur un substrat de verre. La goutte contenant les particules en suspension est recouverte par une lame de verre pour faciliter l'observation au microscope. Sous l'action de la force diélectrophorétique, nous souhaitons que les particules soient déplacées vers le bord de goutte.

Les électrodes imaginées ont été dimensionnées sur la base de résultats de simulation du champ électrique. En effet, la géométrie de l'électrode est un facteur expérimental important pour le contrôle du facteur $E \cdot \nabla E$ intervenant dans la formule mathématique de la force diélectrophorétique. Une valeur de l'ordre de $10^{12} \text{ V}^2/\text{m}^3$ de ce facteur peut induire une force importante sur des cellules biologiques [Pethig, 2010].

Ce travail préliminaire a débouché sur trois réseaux d'électrodes inter digitées. Chaque réseau est formé d'électrodes ayant une forme géométrique différente (rectangle, triangle et losange). La caractéristique commune est que l'espace inter électrode s'accroît dans le sens de la longueur. Ces trois types d'électrodes ont été conçus pour que la valeur du facteur $E \cdot \nabla E$ soit supérieure à $10^{12} \text{ V}^2/\text{m}^3$ dans le sens de la longueur. Ainsi, en théorie, les particules subissant la diélectrophorèse négative devraient être repoussées vers les extérieurs des électrodes (cf. figure 2.26).

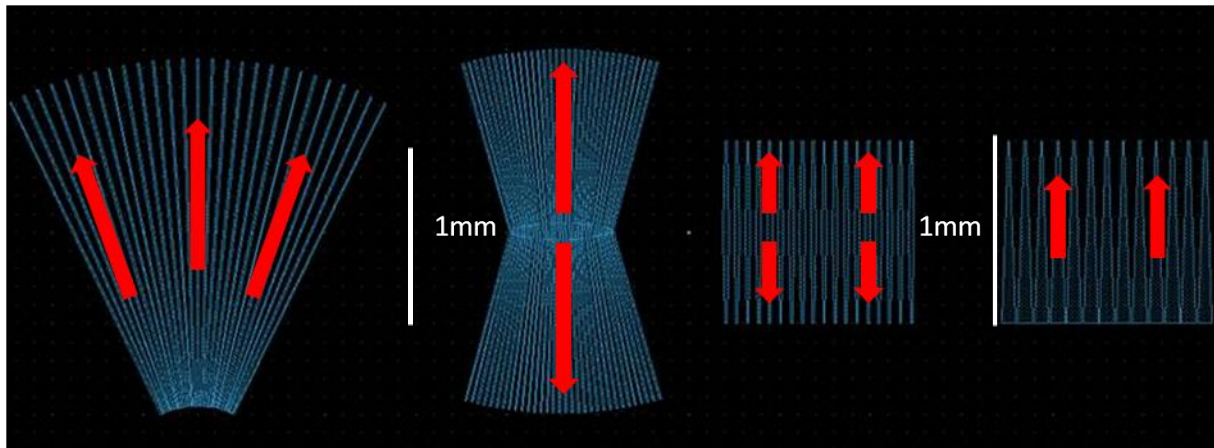


Figure 2.26 : Dessin des géométries employées. Les flèches rouges indiquent le sens souhaité du mouvement des particules

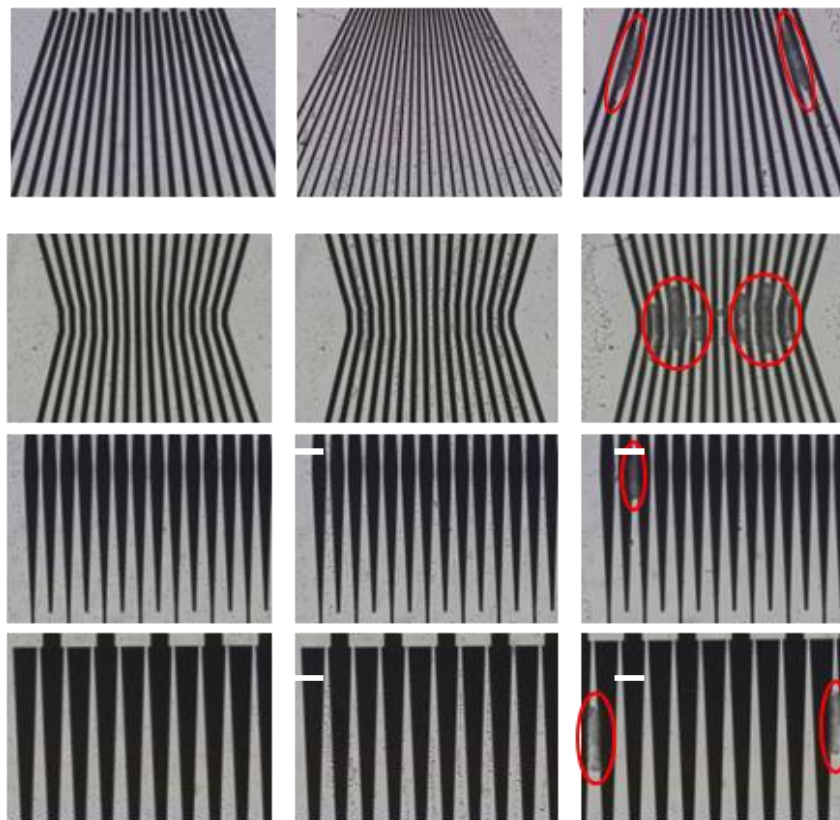


Figure 2.27 : Séquences temporelles (de gauche à droite) des expériences de diélectrophorèse avec des parasites (oocystes *Cryptosporidium parvum*) sur des géométries d'électrodes originales. Les effets électro-hydrodynamiques permettent de concentrer les oocystes dans des zones précises (cercles rouges). $V = 7 \text{ Vpp}$, $f = 300 \text{ kHz}$ (barre d'échelle blanche = $100 \mu\text{m}$).

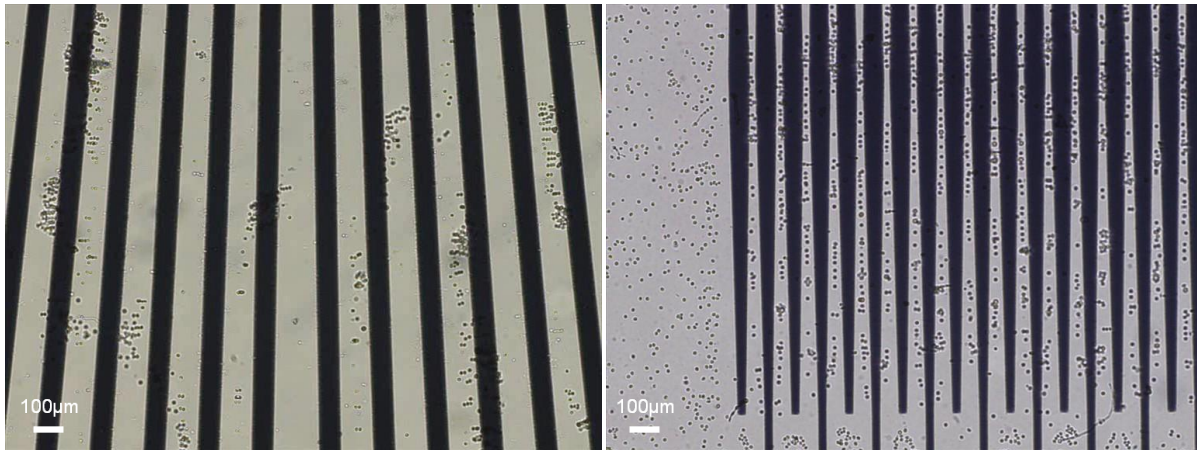


Figure 2.28 : Photographies d'un résultat expérimental où la géométrie ne permet pas de concentrer les particules.

Un premier système de puits sur substrat de verre a été fabriqué grâce aux techniques de photolithographie. Il contient diverses géométries avec quelques variations (espace inter électrode, largeur d'électrodes). Les électrodes, en or pour une meilleure stabilité chimique, sont excitées par un générateur de tension.

Les premiers résultats expérimentaux se sont avérés différents de ceux attendus. Des phénomènes de convection ont été observés. Dans certains cas, les particules ont été transportées par de larges mouvements de fluide dans toute la zone du réservoir recouverte d'électrodes. Au bout d'un certain temps (de l'ordre de cinq minutes), les particules étaient regroupées en amas en des zones très localisées (figure 2.27).

L'intérêt de ce résultat est que les amas sont situés au niveau des bords du système d'électrode. Par conséquent, l'objectif d'amener les particules sur les bords de la goutte est tout de même rempli.

Le deuxième point intéressant est que le résultat varie en fonction de la géométrie. Ainsi, certains puits ne sont pas le siège de courants d'ampleurs rassemblant les particules (figure 2.28). Les caractéristiques géométriques du système d'électrode, notamment la largeur d'une électrode et l'espace inter-électrodes, ont une influence primordiale sur la mise en place des phénomènes générés par l'excitation électrique (phénomènes électrocinétiques).

2.6 Conclusion

L'une des fonctions majeures du système que l'on souhaite concevoir est la concentration de l'échantillon. Cette étape préliminaire est primordiale pour le développement d'un laboratoire sur puce le plus autonome possible.

Cette fonction repose sur l'exploitation de techniques de manipulations de micro-objets. L'état de l'art sur ce sujet montre la diversité des techniques employées, pour une multitude d'applications, notamment dans le domaine de la biologie. Afin de faciliter l'intégration de cette fonction dans un système de déplacement de gouttes par électromouillage, la technique de diélectrophorèse a été sélectionnée pour rassembler les particules d'intérêt dans un réservoir.

La stratégie adoptée a été de tester séparément la partie concentration afin de s'affranchir des contraintes technologiques liées à la technique EWOD. La conception des électrodes de concentration est basée sur l'étude du gradient de champ électrique, afin d'obtenir une force diélectrophorétique susceptible de déplacer les particules.

Les premiers résultats expérimentaux ont mis en lumière la présence de phénomènes électrocinétiques générant des mouvements de fluide très importants. Le résultat de l'équilibre des forces en présence est très dépendant de la géométrie du système d'électrodes, notamment de l'espace inter-électrodes et de leur largeur.

Ce constat montre la nécessité de comprendre plus finement les phénomènes mis en jeu lors de l'application d'un champ électrique dans un liquide contenant des particules en suspension. La diélectrophorèse n'est pas le seul effet à prendre en compte. Pour ce faire, un modèle numérique a été utilisé pour la simulation des phénomènes électrocinétiques existant dans le système de concentration.

Les travaux de simulation sont présentés dans le chapitre suivant.

Bibliographie du chapitre 2

[Abdelgawad et al., 2008] Abdelgawad, M., Freire, S. L. S., Yang, H., & Wheeler, A. R. (2008). All-terrain droplet actuation. *Lab Chip*, 8, 672–677.

[Arrowood, 2002] Arrowood, M. J. (2002). In vitro cultivation of cryptosporidium species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3), 390–400.

[Berge, 1993] Berge, B. (1993). Electrocapillarite et mouillage de films isolants par l'eau. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2, Mécanique, Physique, Chimie, Sciences de l'univers, Sciences de la Terre*, 317, 157–163.

[Bhatt et al., 2005] Bhatt, K. H., Grego, S., & Velez, O. D. (2005). An ac electrokinetic technique for collection and concentration of particles and cells on patterned electrodes. *Langmuir*, 21(14), 6603–6612.

[Bocchi et al., 2009] Bocchi, M., Lombardini, M., Faenza, A., Rambelli, L., Giulianelli, L., Pecorari, N., & Guerrieri, R. (2009). Dielectrophoretic trapping in microwells for manipulation of single cells and small aggregates of particles. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1177–1183.

[Braschler et al., 2008] Braschler, T., Demierre, N., Nascimento, E., Silva, T., Oliva, A. G., & Renaud, P. (2008). Continuous separation of cells by balanced dielectrophoretic forces at multiple frequencies. *Lab Chip*, 8, 280–286.

[Brown & Betts, 2001] Brown, A. P. & Betts, W. B. (2001). A dielectrophoresis system for rapid analysis of cryptosporidium parvum. In M. Smith & K. Thompson (Eds.), *Cryptosporidium: The Analytical Challenge* (pp. 84–87). The Royal Society of Chemistry.

[Cen et al., 2004] Cen, E. G., Dalton, C., Li, Y., Adamia, S., Pilarski, L. M., & Kaler, K. V. I. S. (2004). A combined dielectrophoresis, traveling wave dielectrophoresis and electrorotation microchip for the manipulation and characterization of human malignant cells. *Journal of Microbiological Methods*, 58(3), 387–401.

- [Cheng et al., 2009] Cheng, I.-F., Froude, V. E., Zhu, Y., Chang, H.-C., & Chang, H.-C. (2009). A continuous high-throughput bioparticle sorter based on 3d traveling-wave dielectrophoresis. *Lab Chip*, 9, 3193–3201.
- [Cho et al., 2003] Cho, S. K., Moon, H., & Kim, C.-J. (2003). Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 12(1), 70–80.
- [Cho et al., 2007] Cho, S. K., Zhao, Y., & Kim, C.-J. C. (2007). Concentration and binary separation of micro particles for droplet-based digital microfluidics. *Lab Chip*, 7(4), 490–498.
- [Chou & Zenhausern, 2003] Chou, C.-F. & Zenhausern, F. (2003). Electrodeless dielectrophoresis for micro total analysis systems. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 22(6), 62–67.
- [Demierre et al., 2007] Demierre, N., Braschler, T., Linderholm, P., Seger, U., van Lintel, H., & Renaud, P. (2007). Characterization and optimization of liquid electrodes for lateral dielectrophoresis. *Lab Chip*, 7, 355–365.
- [Dittrich & Manz, 2006] Dittrich, P. S. & Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 5(3), 210–218.
- [Docoslis et al., 2007] Docoslis, A., Tercero Espinoza, L. A., Zhang, B., Cheng, L.-L., Israel, B. A., Alexandridis, P., & Abbott, N. L. (2007). Using nonuniform electric fields to accelerate the transport of viruses to surfaces from media of physiological ionic strength. *Langmuir*, 23(7), 3840–3848.
- [El-Ali et al., 2006] El-Ali, J., Sorger, P. K., & Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*, 442(7101), 403–411.
- [Enger et al., 2004] Enger, J., Goksor, M., Ramser, K., Hagberg, P., & Hanstorp, D. (2004). Optical tweezers applied to a microfluidic system. *Lab Chip*, 4, 196–200.
- [Fan et al., 2008] Fan, S.-K., Huang, P.-W., Wang, T.-T., & Peng, Y.-H. (2008). Cross-scale electric manipulations of cells and droplets by frequency-modulated dielectrophoresis and electrowetting. *Lab Chip*, 8(8), 1325–1331.

- [Fan et al., 2010] Fan, S.-K., Yang, H., & Hsu, W. (2010). Droplet-on-a-wristband: Chip-to-chip digital microfluidic interfaces between replaceable and flexible electrowetting modules. *Lab Chip*, 11, 343–347.
- [Fiedler et al., 1998] Fiedler, S., Shirley, S. G., Schnelle, T., & Fuhr, G. (1998). Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Analytical Chemistry*, 70(9), 1909–1915.
- [Flores-Rodriguez & Markx, 2006] Flores-Rodriguez, N. & Markx, G. H. (2006). Flow-through devices for the ac electrokinetic construction of microstructured materials. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(2), 349–355.
- [Fouillet, 2007] Fouillet, Y. (2007). Plate-forme microfluidique discrète et électromouillage. In *18ème Congrès Français de Mécanique, Grenoble, 27-31 août 2007*.
- [Gascoyne et al., 2002] Gascoyne, P., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J., Watcharasit, P., & Becker, F. F. (2002). Microsample preparation by dielectrophoresis: isolation of malaria. *Lab Chip*, 2, 70–75.
- [Goater et al., 1997] Goater, A. D., Burt, J. P. H., & Pethig, R. (1997). A combined travelling wave dielectrophoresis and electrorotation device: applied to the concentration and viability determination of cryptosporidium. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 30(18), L65–L69.
- [Grom et al., 2006] Grom, F., Kentsch, J., Müller, T., Schnelle, T., & Stelzle, M. (2006). Accumulation and trapping of hepatitis a virus particles by electrohydrodynamic flow and dielectrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 27(7), 1386–1393.
- [Gu et al., 2008] Gu, H., Malloggi, F., Vanapalli, S. A., & Mugele, F. (2008). Electrowetting-enhanced microfluidic device for drop generation. *Appl. Phys. Lett.*, 93(18), 183507–3.
- [Higginbotham & Sweatman, 2008] Higginbotham, S. N. & Sweatman, D. R. (2008). A combined travelling wave dielectrophoresis and impedance sensing device for sensing biological cell suspensions. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41(17), 175503 (9pp).
- [Houssin, 2011] Houssin, T. (2011). *BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance*. PhD thesis, Université de Lille Nord de France.

[Hua et al., 2010] Hua, Z., Rouse, J. L., Eckhardt, A. E., Srinivasan, V., Pamula, V. K., Schell, W. A., Benton, J. L., Mitchell, T. G., & Pollack, M. G. (2010). Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform. *Analytical Chemistry*, 82(6), 2310–2316.

[Hunt et al., 2008] Hunt, T. P., Issadore, D., & Westervelt, R. M. (2008). Integrated circuit/microfluidic chip to programmably trap and move cells and droplets with dielectrophoresis. *Lab on a Chip*, 8(1), 81–87.

[Jebraïl & Wheeler, 2010] Jebraïl, M. & Wheeler, A. (2010). Let's get physical: digitizing chemical biology with microfluidics. *Current opinion in chemical biology*, 14, 574–581.

[Johansson et al., 2010] Johansson, L., Gunnarsson, K., Bijelovic, S., Eriksson, K., Surpi, A., Gothelid, E., Svedlindh, P., & Oscarsson, S. (2010). A magnetic microchip for controlled transport of attomole levels of proteins. *Lab Chip*, 10, 654–661.

[Jonsson-Niedziolka et al., 2011] Jonsson-Niedziolka, M., Lapierre, F., Coffinier, Y., Parry, S. J., Zoueshtiagh, F., Foat, T., Thomy, V., & Boukherroub, R. (2011). Ewod driven cleaning of bioparticles on hydrophobic and superhydrophobic surfaces. *Lab Chip*, 11, 490–496.

[Jung & Kwak, 2007] Jung & Kwak, H.-Y. (2007). Separation of microparticles and biological cells inside an evaporating droplet using dielectrophoresis. *Analytical Chemistry*, 79(13), 5087–5092.

[Khoshmanesh et al., 2011] Khoshmanesh, K., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A., & Kalantar-zadeh, K. (2011). Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1800–1814.

[Kim & Steckl, 2010] Kim, D. Y. & Steckl, A. J. (2010). Electrowetting on paper for electronic paper display. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2(11), 3318–3323.

[Korbel et al., 2011] Korbel, D. S., Barakat, F. M., Di Santo, J. P., & McDonald, V. (2011). Cd4+ t cells are not essential for control of early acute cryptosporidium parvum infection in neonatal mice. *Infection and Immunity*, 79, 1647–1653.

[Krishnan & Heller, 2009] Krishnan, R. & Heller, M. J. (2009). An ac electrokinetic method for enhanced detection of dna nanoparticles. *Journal of Biophotonics*, 2(4), 253–261.

[Kumar et al., 2010] Kumar, A., Kwon, J.-S., Williams, S. J., Green, N. G., Yip, N. K., & Wereley, S. T. (2010). Optically modulated electrokinetic manipulation and concentration of colloidal particles near an electrode surface. *Langmuir*, 26(7), 5262–5272.

[Lagally et al., 2005] Lagally, E. T., Lee, S.-H., & Soh, H. T. (2005). Integrated microsystem for dielectrophoretic cell concentration and genetic detection. *Lab Chip*, 5(10), 1053–1058.

[Lapierre, 2011] Lapierre, F. (2011). *Electromouillage sur diélectrique (EWOD) conception et réalisation de dispositifs microfluidiques originaux sur surfaces superhydrophobes*. PhD thesis, Université Lille Nord de France.

[Lapierre et al., 2011] Lapierre, F., Piret, G., Drobecq, H., Melnyk, O., Coffinier, Y., Thomy, V., & Boukherroub, R. (2011). High sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of peptides using silicon nanowires-based digital microfluidic device. *Lab Chip*, 11, 1620–1628.

[Lapizco-Encinas et al., 2004] Lapizco-Encinas, B., Simmons, B., Cummings, E., & Fintschenko, Y. (2004). Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators. *Analytical Chemistry*, 76(6), 1571–1579.

[Lapizco-Encinas et al., 2005] Lapizco-Encinas, B. H., Davalos, R. V., Simmons, B. A., Cummings, E. B., & Fintschenko, Y. (2005). An insulator-based (electrodeless) dielectrophoretic concentrator for microbes in water. *Journal of Microbiological Methods*, 62(3), 317–326.

[Lei et al., 2009a] Lei, K. F., Cheng, H., Choy, K. Y., & Chow, L. M. (2009a). Electrokinetic dna concentration in microsystems. *Sensors and Actuators A: Physical*, 156(2), 381–387.

[Lei et al., 2009b] Lei, U., Huang, C., Chen, J., Yang, C., Lo, Y., Wo, A., Chen, C., & Fung, T. (2009b). A travelling wave dielectrophoretic pump for blood delivery. *Lab Chip*, 9, 1349–1356.

[Li & Bashir, 2002] Li, H. & 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.

[Lippmann, 1875] Lippmann, G. (1875). Relation between capillary and electrical phenomena. *Annales de Chimie et de Physique*, 5, 494–549.

[Manaresi et al., 2003] Manaresi, N., Romani, A., Medoro, G., Altomare, L., Leonardi, A., Tartagni, M., & Guerrieri, R. (2003). A cmos chip for individual cell manipulation and detection. *Solid-State Circuits, IEEE Journal of*, 38(12), 2297–2305.

[Medoro et al., 2003] Medoro, G., Manaresi, N., Leonardi, A., Altomare, L., Tartagni, M., & Guerrieri, R. (2003). A lab-on-a-chip for cell detection and manipulation. *Sensors Journal, IEEE*, 3(3), 317–325.

[Medoro et al., 2007] Medoro, G., Nastruzzi, C., Guerrieri, R., Gambari, R., & Manaresi, N. (2007). Lab on a chip for live-cell manipulation. *Design Test of Computers, IEEE*, 24(1), 26–36.

[Mernier et al., 2010] Mernier, G., Piacentini, N., Braschler, T., Demierre, N., & Renaud, P. (2010). Continuous-flow electrical lysis device with integrated control by dielectrophoretic cell sorting. *Lab Chip*, 10(16), 2077–2082.

[Moon et al., 2011] Moon, H.-S., Kwon, K., Kim, S.-I., Han, H., Sohn, J., Lee, S., & Jung, H.-I. (2011). Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (moff) and dielectrophoresis (dep). *Lab Chip*, 11, 1118–1125.

[Mugele, 2009] Mugele, F. (2009). Fundamental challenges in electrowetting: from equilibrium shapes to contact angle saturation and drop dynamics. *Soft Matter*, 5, 3377–3384.

[Mugele & Buehrle, 2007] Mugele, F. & Buehrle, J. (2007). Equilibrium drop surface profiles in electric fields. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19(37), 375112 (20pp).

[Pethig, 2010] Pethig, R. (2010). Review article-dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics*, 4(3), 039901 (35pp).

[Piret, 2010] Piret, G. (2010). *Nanofils de silicium pour une analyse sensible de biomolécules par spectrométrie de masse et pour l'adressage fluide de cellules, en vue des applications laboratoires sur puce et biopuces*. PhD thesis, Université Lille Nord de France.

[Pohl & Crane, 1971] Pohl, H. A. & Crane, J. S. (1971). Dielectrophoresis of cells. *Biophysical Journal*, 11(9), 711–727.

[Raghavan et al., 2010] Raghavan, R., Friend, J., & Yeo, L. (2010). Particle concentration via acoustically driven microcentrifugation: micropiv flow visualization and numerical modelling studies. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8(1), 73–84.

[Rajaraman et al., 2006] Rajaraman, S., Noh, H.-s. M., Hesketh, P. J., & Gottfried, D. S. (2006). Rapid, low cost microfabrication technologies toward realization of devices for dielectrophoretic manipulation of particles and nanowires. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(1), 392–401.

[Ramadan et al., 2010] Ramadan, Q., Christophe, L., Teo, W., ShuJun, L., & Hua, F. H. (2010). Flow-through immunomagnetic separation system for waterborne pathogen isolation and detection: Application to giardia and cryptosporidium cell isolation. *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 101–108.

[Ren et al., 2004] Ren, H., Fair, R. B., & Pollack, M. G. (2004). Automated on-chip droplet dispensing with volume control by electro-wetting actuation and capacitance metering. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 98(2-3), 319–327.

[Rousselet et al., 1998] Rousselet, J., Markx, G. H., & Pethig, R. (1998). Separation of erythrocytes and latex beads by dielectrophoretic levitation and hyperlayer field-flow fractionation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 140(1-3), 209–216.

[Satoh et al., 2008] Satoh, W., Yokomaku, H., Hosono, H., Ohnishi, N., & Suzuki, H. (2008). Electrowetting-based valve for the control of the capillary flow. *J. Appl. Phys.*, 103(3), 034903 (9pp).

[Shafiee et al., 2010] Shafiee, H., Sano, M. B., Henslee, E. A., Caldwell, J. L., & Davalos, R. V. (2010). Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cdep). *Lab Chip* 11, 10(4), 438–445.

[Shah & Kim, 2009] Shah, G. & Kim, C.-J. (2009). Meniscus-assisted high-efficiency magnetic collection and separation for ewod droplet microfluidics. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 18(2), 363–375.

[Shah et al., 2009] Shah, G. J., Ohta, A. T., Chiou, E. P.-Y., Wu, M. C., & Kim, C.-J. C. (2009). Ewod-driven droplet microfluidic device integrated with optoelectronic tweezers as an automated platform for cellular isolation and analysis. *Lab on a Chip*, 9(12), 1732–1739.

[Shamai et al., 2008] Shamai, R., Andelman, D., Berge, B., & Hayes, R. (2008). Water, electricity, and between... on electrowetting and its applications. *Soft Matter*, 4, 38–45.

[Sin et al., 2009] Sin, M. L. Y., Shimabukuro, Y., & Wong, P. K. (2009). Hybrid electrokinetics for separation, mixing, and concentration of colloidal particles. *Nanotechnology*, 20(16), 165701 (9pp).

[Sista et al., 2008] Sista, R., Hua, Z., Thwar, P., Sudarsan, A., Srinivasan, V., Eckhardt, A., Pollack, M., & Pamula, V. (2008). Development of a digital microfluidic platform for point of care testing. *Lab on a Chip*, 8, 2091–2104.

[Song et al., 2009] Song, J., Evans, R., Lin, Y.-Y., Hsu, B.-N., & Fair, R. (2009). A scaling model for electrowetting-on-dielectric microfluidic actuators. *Microfluidics and Nanofluidics*, 7, 75–89.

[Suzuki et al., 2008] Suzuki, M., Yasukawa, T., Shiku, H., & Matsue, T. (2008). Negative dielectrophoretic patterning with different cell types. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 1043–1047.

[Taff & Voldman, 2005] Taff, B. M. & Voldman, J. (2005). A scalable addressable positive-dielectrophoretic cell-sorting array. *Analytical Chemistry*, 77(24), 7976–7983.

[Thomas et al., 2009] Thomas, R. S., Morgan, H., & Green, N. G. (2009). Negative dep traps for single cell immobilisation. *Lab Chip*, 9, 1534–1540.

[Urdaneta & Smela, 2008] Urdaneta, M. & Smela, E. (2008). Parasitic trap cancellation using multiple frequency dielectrophoresis, demonstrated by loading cells into cages. *Lab Chip*, 8, 550–556.

[USEPA, 2005] USEPA (2005). *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA* (<http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>). Technical report, USEPA.

[Valley et al., 2011] Valley, J. K., NingPei, S., Jamshidi, A., Hsu, H.-Y., & Wu, M. C. (2011). A unified platform for optoelectrowetting and optoelectronic tweezers. *Lab Chip*, 11, 1292–1297.

[Verplanck, 2007] Verplanck, N. (2007). *Développement de microsystèmes EWOD sur surfaces hydrophobes et superhydrophobes, application à la spectrométrie de masse*. PhD thesis, Université Lille Nord de France.

[Verplanck et al., 2007] Verplanck, N., Coffinier, Y., Thomy, V., & Boukherroub, R. (2007). Wettability switching techniques on superhydrophobic surfaces. *Nanoscale Research Letters*, 2(12), 577–596.

[Wang et al., 2007a] Wang, L., Flanagan, L. A., Jeon, N. L., Monuki, E., & Lee, A. P. (2007a). Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry. *Lab Chip*, 7, 1114–1120.

[Wang et al., 2011] Wang, X., Chen, S., Kong, M., Wang, Z., Costa, K. D., Li, R. A., & Sun, D. (2011). Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. *Lab Chip*, 11, 3656–3662.

[Wang et al., 2007b] Wang, Y., Zhao, Y., & Cho, S. K. (2007b). Efficient in-droplet separation of magnetic particles for digital microfluidics. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(10), 2148–2156.

[Williams et al., 2010] Williams, S. J., Kumar, A., Green, N. G., & Wereley, S. T. (2010). Optically induced electrokinetic concentration and sorting of colloids. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 20(1), 015022 (11pp).

[Williams et al., 2008] Williams, S. J., Kumar, A., & Wereley, S. T. (2008). Electrokinetic patterning of colloidal particles with optical landscapes. *Lab Chip*, 8, 1879–1882.

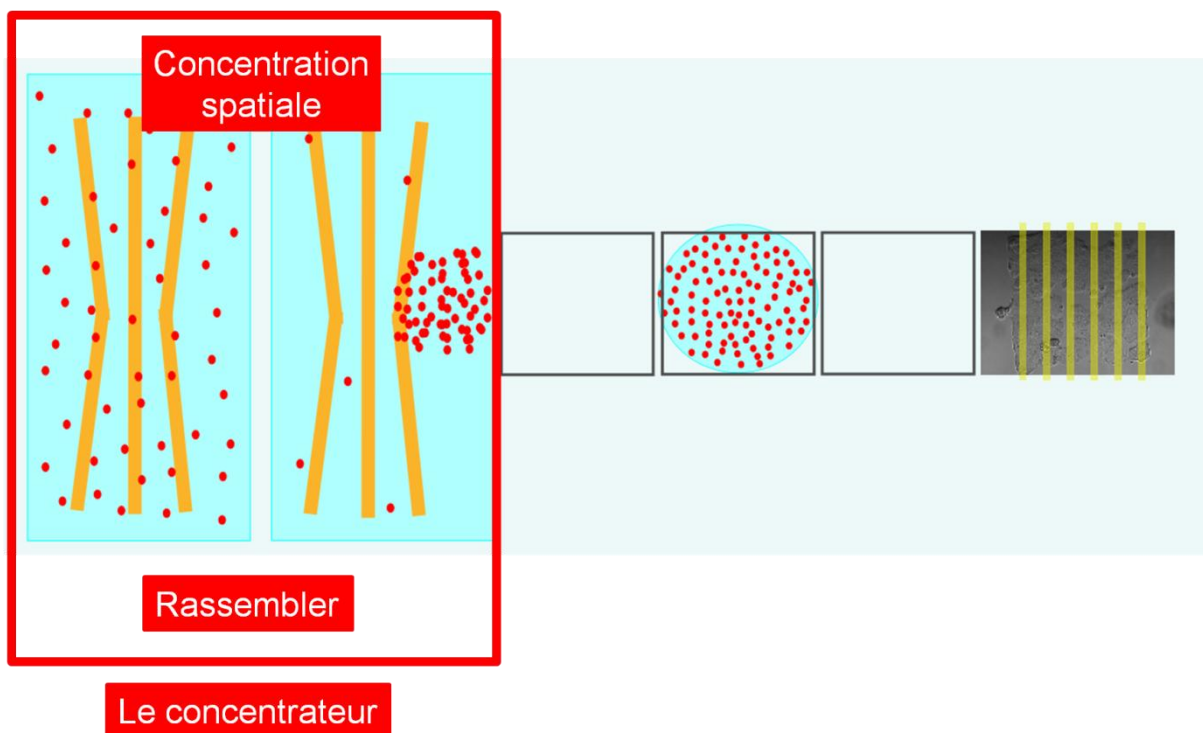
[Yang et al., 2006] Yang, L., Banada, P. P., Chatni, M. R., Seop Lim, K., Bhunia, A. K., Ladisch, M., & Bashir, R. (2006). A multifunctional micro-fluidic system for dielectrophoretic concentration coupled with immuno-capture of low numbers of listeria monocytogenes. *Lab Chip*, 6, 896–905.

[Yantzi et al., 2007] Yantzi, J., Yeow, J., & Abdallah, S. (2007). Multiphase electrodes for microbead control applications: Integration of dep and electrokinetics for bio-particle positioning. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2539–2545.

[Zhang et al., 2009] Zhang, C., Khoshmanesh, K., Tovar-Lopez, F., Mitchell, A., Wlodarski, W., & Klantar-zadeh, K. (2009). Dielectrophoretic separation of carbon nanotubes and polystyrene microparticles. *Microfluidics and Nanofluidics*, 7(5), 633–645.

[Zhao et al., 2007] Zhao, Y., Yi, U.-C., & Cho, S. K. (2007). Microparticle concentration and separation by traveling-wave dielectrophoresis (twdep) for digital microfluidics. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 16(6), 1472–1481.

3 : Modélisation et simulation du concentrateur



3.1 Préambule

Le principe du concentrateur repose sur les phénomènes électro hydrodynamiques générés lors de l'application d'un champ électrique alternatif non uniforme à une solution liquide contenant des particules.

Le champ électrique est créé par l'application d'une différence de potentiel aux bornes de microélectrodes métalliques. Les paramètres influençant le mouvement des particules sont :

- la conductivité du liquide
- la taille des particules
- l'intensité du champ électrique
- la fréquence du champ électrique
- la géométrie des électrodes

Le système de concentration est composé d'électrodes inter-digitées tapissant le fond d'un réservoir rectangulaire d'une hauteur de 200 μm . La surface du fond du puits est de l'ordre du mm^2 . Les plus grands réservoirs ont une surface de 25 mm^2 . Une fois le puits rempli par une solution de particules, il est recouvert par une lame couvre-objet en verre. La goutte de liquide est de forme parallélépipédique.

L'application d'une excitation électrique aux bornes des électrodes engendre divers phénomènes dynamiques. Le champ électrique interagit avec le fluide et les particules. Sous certaines conditions, l'équilibre des différentes forces en présence amène les particules dans des zones très localisées du réservoir.

3.2 Introduction

L'utilisation des forces électrocinétiques est très adaptée pour la manipulation de micro-objets en microenvironnement. Le concentrateur a pour fonction de rassembler les particules en suspension dans un large réservoir en des zones très localisées grâce à ces forces. La condition nécessaire au rassemblement des particules est leur lévitation au dessus des électrodes. Cette condition n'est cependant pas suffisante. Il faut également qu'elles soient emportées par de larges courants de liquide concentrant au sein de tourbillons. La lévitation est exercée par la force diélectrophorétique alors que les mouvements de liquide sont générés par des phénomènes électrohydrodynamiques. L'équilibre et l'évolution de ces forces sont complexes car dépendant de nombreux paramètres constitutifs des matériaux, du système et du signal d'excitation. Ce chapitre a pour objectif de comprendre de manière détaillée le comportement de cette fonction « concentration » en fonction des principaux paramètres mis en jeu.

Les phénomènes électrocinétiques AC sont au cœur des problématiques liées aux manipulations de micro-nano objets au sein des laboratoires sur puce. La littérature est composée de nombreuses études analytiques sur le sujet. N.G Green, A. Ramos et A. Castellanos apportent des éléments importants sur le mouvement et le comportement de particules en suspension dans un liquide soumis à un champ électrique non uniforme [Green et al., 2000c, Castellanos et al., 2003]. Les ordres de grandeurs des forces diélectrophorétiques (DEP), électro-osmotiques (EOO) et électrothermiques (ACET) sont calculés en fonction de la longueur caractéristique du microsysteme.

Les paramètres principaux régissant ces phénomènes sont :

- la fréquence et l'amplitude du signal d'excitation
- la conductivité du milieu environnant
- les propriétés diélectriques de la particule
- le gradient du champ électrique, directement lié à la géométrie des électrodes du système

La majorité des travaux sur le domaine expose des résultats de simulation en 2 dimensions sur des systèmes de microélectrodes parallèles inter-digitées, de deux de ces trois phénomènes (DEP, EOO, ACET). Une étude expérimentale y est généralement associée.

La DEP est une technique de manipulation de microparticules très efficaces et facilement intégrable au sein de dispositifs microfluidiques. Elle est employée comme alternative à la cytométrie en flux en microenvironnement [Fiedler et al., 1998]. En modulant le temps d'application de la force DEP (par un signal pulsé par exemple), il est possible de séparer des particules de différentes tailles [Cui et al., 2009]. Différents types d'électrodes sont modélisés et optimisés pour la fabrication de pièges en deux [Hunt et al., 2008, Rosenthal & Voldman, 2005, Thomas et al., 2009], ou trois dimensions [Voldman et al., 2003] pour la capture de cellules uniques.

La force ACET peut être utilisée pour la réalisation de fonctions microfluidiques de capture et de pompage de particules biologiques. Jang et al ont montré l'influence de la DEP et de l'ACET dans des milieux très conducteurs (type milieu de culture cellulaire) et ils ont utilisé ces effets pour la capture de cellules uniques grâce à des électrodes quadripolaires [Jang et al., 2009]. Dans une étude sur la capture de nanofils par diélectrophorèse, l'effet électrothermique a été quantifié et utilisé pour améliorer l'efficacité du système [Lin et al., 2007]. Dans le même esprit, un système de pompage de particules reposant sur des électrodes asymétriques a été testé et simulé pour des liquides à forte conductivité [Lian et al., 2007], mettant en lumière l'importance des effets thermiques.

De même, les effets électro-osmotiques AC (ACEOO) ont été largement étudiés car ils sont prépondérants dans les systèmes de microfluidique composés d'électrodes planaires. N.G. Green, A. Castellanos et A. Ramos ont établi un modèle analytique de la vitesse électro-osmotique [Ramos et al., 1999b, Green et al., 2000b, Green et al., 2000a, Green et al., 2002]. Il est bien adapté pour des cas simples d'électrodes planaires directement en contact avec le milieu. Cependant, Squires et al. rappellent dans un review que de nombreux challenges théoriques restent à être relevés, notamment au niveau du phénomène de double couche et des réactions électrochimiques qui peuvent intervenir [Squires, 2009].

Dans un premier temps, nous présentons les modèles qui permettent de calculer les forces induisant le mouvement d'une microparticule et qui sont engendrées par l'application d'un champ électrique alternatif dans un électrolyte.

Dans un deuxième temps, le modèle détaillé dans la partie précédente est exploité dans des simulations 2D et 3D.

L'exploitation de ce travail de modélisation permet de définir une gamme de valeurs pour différents paramètres (la fréquence, potentiel électrique, la conductivité et la géométrie) qui assure une concentration des microparticules.

3.3 Bilan des forces

Cette section fournit les arguments physiques essentiels qui ont permis de modéliser les différentes forces qui s'appliquent aux colloïdes. La modélisation de ces forces permet ensuite de résoudre la relation fondamentale de la dynamique et donc de prédire le mouvement des particules au sein de l'électrolyte.

3.3.1 Forces électrocinétiques AC

L'excitation électrique AC d'un électrolyte contenant des particules colloïdales provoque de nombreux phénomènes dynamiques au sein de cet électrolyte. Nous présentons dans la section 2.1 les forces électrocinétiques induites par un champ électrique non uniforme créé par la polarisation AC d'un réseau de microélectrode. Nous détaillons dans un premier temps la force diélectrophorétique qui agit sur les colloïdes (section 2.1.1) puis la force d'électroconvection (section 2.1.2), et la force d'électroosmose qui agissent sur l'électrolyte (section 2.1.3).

3.3.1.1 La force diélectrophorétique

La force diélectrophorétique est induite par un champ électrique alternatif non-uniforme qui impose une différence de pression électrostatique sur le colloïde, particule polarisable, en suspension dans l'électrolyte qui est lui-même polarisable.

Au repos et sans champ électrique, la particule peut présenter des charges surfaciques qui sont contrebalancées par des ions contenus dans l'électrolyte (figure 3.1) [Lyklema, 1995].

Placée dans un champ continu uniforme (figure 3.1), la particule présentera un dipôle répondant à la contrainte électrique imposée et les contre ions avoisinants assureront l'électroneutralité de la particule. D'autre part, si la particule est plus polarisable que le

milieu, le déplacement de charge induit dans la particule sera plus important que celui des contre ions environnants. Ceci donnera naissance à un moment dipolaire dont l'orientation sera celle du champ électrique (figure 3.1.b1 et .c1). A l'inverse, si la particule est moins polarisable, la direction du moment dipolaire induit sera inversée (Figure 3.1.b2 et .c2).

Dans le cas d'un champ électrique alternatif, le dipôle induit par le mouvement de charge dans la particule suivra les changements de sens du champ électrique et ce de manière non-instantanée puisque le temps de déplacement des porteurs est non nul. A basse fréquence, ce temps de déplacement est beaucoup plus court que la période du champ électrique et donc la particule est plus polarisable que le milieu. A l'inverse, à haute fréquence, les porteurs de charge n'ont pas le temps de se déplacer, et la particule devient moins polarisable que le milieu qui l'entoure.

Enfin, dans une configuration de champ électrique alternatif et non-uniforme, le dipôle induit répond à une différence de pression électrostatique d'une face à l'autre du colloïde (Figure 3.1.bc3 et .c4) et la particule se déplace selon le gradient de la norme du champ électrique. Cette pression exerce donc une force, appelée force diélectrophorétique [Pohl, 1950] dont l'expression est donnée par l'équation (3.1) et agit sur les particules en fonction du volume, du gradient de la norme du champ électrique appliqué et de la différence de polarisabilité de la particule et de son milieu de suspension. Cette différence est fonction de la fréquence du champ électrique appliqué et du système particule/milieu de suspension.

$$\langle F_{\text{dep}} \rangle = 2\pi r^3 \varepsilon_m \text{Re}[CM(\omega)] \nabla E^2 \quad (3.1)$$

$$CM(\omega) = \left(\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \right) \quad (3.2)$$

$$\text{où } \varepsilon_p^* = \varepsilon_p - j \frac{\sigma_p}{\omega} \text{ et } \varepsilon_m^* = \varepsilon_m - j \frac{\sigma_m}{\omega}$$

ε_p^* et ε_m^* sont, respectivement, les permittivités complexes de la particule et du milieu, σ_p^* et σ_m^* sont, respectivement, les conductivités de la particule et du milieu et ω est la pulsation du champ électrique. $\text{Re}[CM(\omega)]$ est la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti.

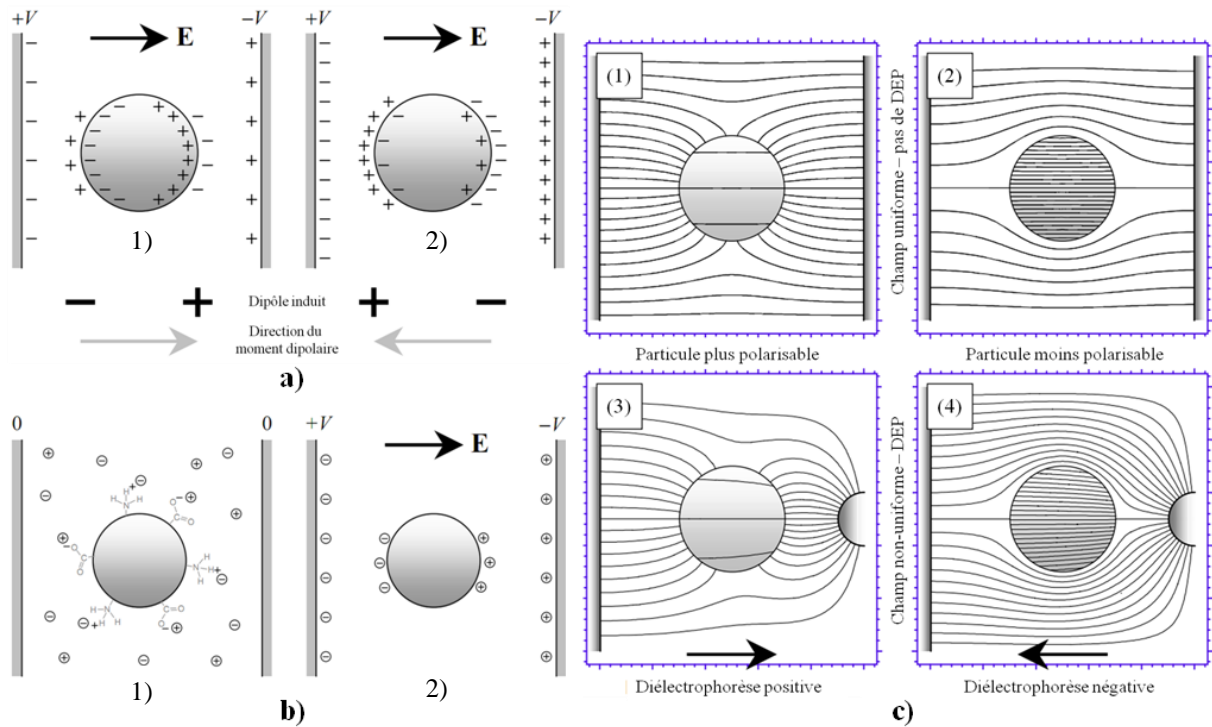


Figure 3.1 : a) Schémas du déplacement des charges d'une particule plongée dans un champ continu lorsque 1) la particule est plus polarisable que le milieu et 2) lorsque la particule est moins polarisable que le milieu, b) Schémas du mouvement des charges d'une particule chargée plongée dans un champ électrique continu, c) Schémas des lignes de champ dans une particule plongée dans des champs uniformes ou non-uniformes lorsque cette particule est plus ou moins polarisable que le milieu qui l'entoure.

La force est quantifiée par le facteur de Clausius-Mossotti dont l'expression générale est donnée par l'équation (3.2). Ainsi, la direction de la force est imposée par le gradient de la norme du champ électrique qui est défini par la géométrie des électrodes. En revanche, le sens de la force est donné par le signe de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Ce facteur est fonction des permittivités complexes de la particule et du milieu. Il faut remarquer que si la mesure des propriétés diélectriques du milieu est réalisable avec des techniques standards, il est en revanche difficile de les établir pour des micro-particules. La littérature montre que des valeurs assez différentes peuvent être extraites en fonction de la méthode utilisée. On modélise classiquement une particule colloïdale en suspension par le schéma de la figure 3.2. Ce schéma fait apparaître une conductance surfacique K_s .

Cette conductance ne peut pas être négligée pour des diamètres de la particule inférieurs à 10 μm puisqu'elle domine le comportement global de la particule. L'expression de la conductance de surface est donnée par l'équation (3.3).

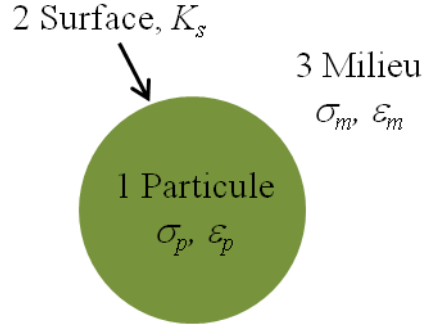


Figure 3.2 : Représentation schématique d'une particule colloïdale dans un milieu diélectrique faisant apparaître les conductivités et permittivités des différents constituants du système.

$$\sigma_{total} = \sigma_p + \sigma_s = \sigma_p + 2 \frac{K_s}{r} \quad (3.3)$$

où r est le rayon de la particule.

Pour mesurer cette conductance surfacique, il existe trois méthodes. La première est la méthode de la fréquence de coupure proposée par Green [Green & Morgan, 1999] qui consiste à mesurer la fréquence du champ alternatif qui annule le facteur de Clausius-Mossotti et donc la force diélectrophorétique. A cette fréquence, les particules ne sont pas attirées ni par l'électrode positive, ni par l'électrode négative. Cependant, à cette échelle, les particules colloïdales sont soumises au mouvement brownien et donc la mesure précise de cette fréquence de coupure est délicate. L'équation (3.4) donne l'expression de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la conductance de surface. Elle permet d'extraire la conductance de surface.

$$Re[CM(\omega)] = \frac{(\epsilon_p - \epsilon_m)(\epsilon_p + 2\epsilon_m) - \frac{(\sigma_m - \sigma_p)(\sigma_m + \frac{K_s}{r})^2}{(\omega/2)^2}}{(\epsilon_p + 2\epsilon_m) + \frac{(\sigma_m + \frac{K_s}{r})^2}{(\omega/2)^2}} \quad (3.4)$$

fréquence de coupure (Hz)

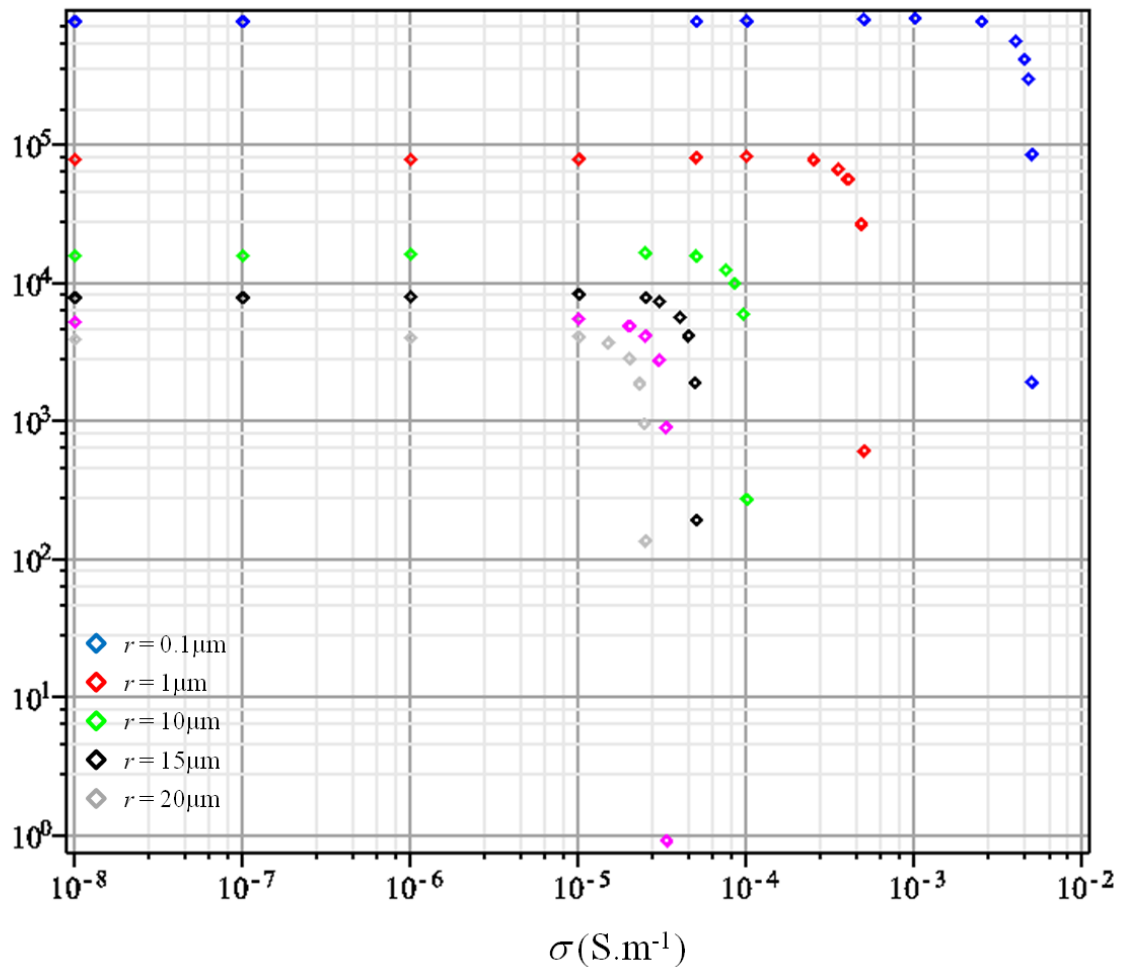


Figure 3.3 : Fréquence de coupure en fonction de la conductivité du milieu pour différentes tailles de particules (bille de latex de taille micronique, $\sigma_p=0\text{S.m}^{-1}$, $K_s=0.25\text{ nS}$). La courbe est obtenue en résolvant l'équation $Re[CM(\omega)]=0$.

La figure 3.3 donne les valeurs de la fréquence de coupure en fonction de la conductivité électrique du milieu, pour différentes tailles de la particule. En deçà de la fréquence de coupure, la particule subit la diléctrophorèse positive. Au-delà de cette fréquence, la particule subit la diléctrophorèse négative. Plus le milieu est conducteur, plus la fréquence de coupure est basse. La fréquence de coupure est plus grande lorsque le rayon de la particule diminue.

Une seconde méthode a été proposée par Morganti [Morganti & Morgan, 2011] qui utilise l'électrorotation. Dans cette expérience, une particule colloïdale est mise en rotation par application d'un champ électrique tournant. La mesure de la vitesse de rotation de la particule permet d'extraire la conductance de surface à partir de l'expression de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti. L'expression de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti est fonction de la conductance de surface. Elle permet d'extraire la conductance de surface. La difficulté ici réside dans la mesure précise de la vitesse de rotation de particules de quelques micromètres de diamètre.

Une dernière méthode a été proposée très récemment par Honegger [Honegger et al., 2011] qui consiste à mesurer la vitesse de déplacement des particules soumises à une configuration purement diélectrophorétique. L'équation (3.5) donne l'expression de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la vitesse de la particule et des paramètres physiques du milieu de suspension.

$$Re[CM(\omega)] = \alpha v_p \text{ où } \alpha = \frac{3\eta}{r^2 \epsilon_m \nabla |E|^2} \quad (3.5)$$

Le tableau 3.1 donne quelques exemples de fréquences de coupure pour différentes solutions colloïdales trouvées dans la littérature.

	Polystyrène	Latex	Silice
$f_{Re[CM(\omega)]=0}$ (MHz)	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.8 ± 0.4
Référence	[Green 1999]	[Wei 1999]	[Hugues 2002]

Tableau 3.1 : Fréquences de coupure de particules colloïdales de 1 μm de diamètre suspendues dans de l'eau déionisée.

A titre d'exemple, la figure 3.4 donne la variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du champ électrique pour différentes particules colloïdales et différentes conductivités [Oh et al., 2009].

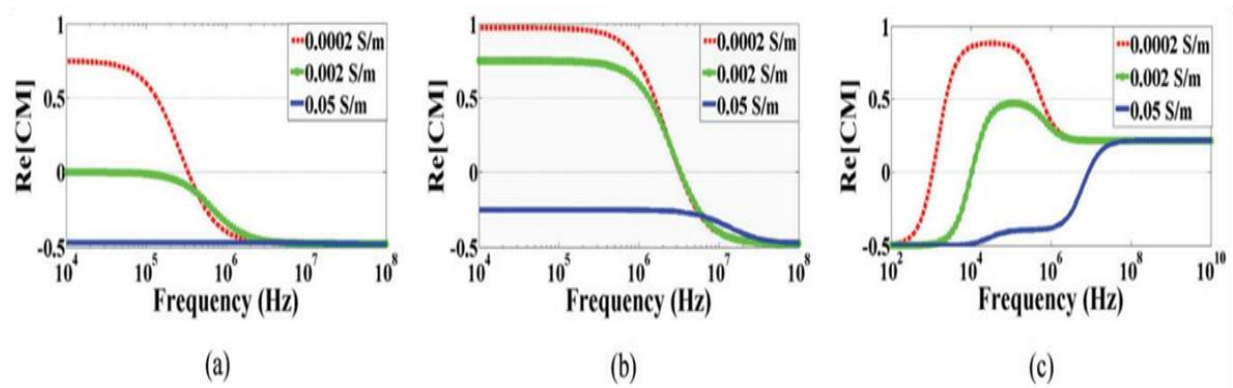


Figure 3.4 : Exemples de variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti pour différentes particules colloïdales : a) Polystyrène 2 μm de diamètre, b) polystyrène 200 nm de diamètre, c) cellule *Chlorella sp.*, en fonction de la fréquence du champ électrique et pour trois conductivités du milieu de suspension [Oh et al., 2009].

Nous constatons sur la figure 3.4 que la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti peut changer de signe dans une gamme de fréquence donnée. On distinguera alors trois régimes. Le régime de diélectrophorèse positive dans lequel la particule est attirée vers le maximum du champ électrique et qui correspond à une valeur positive de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Le régime de diélectrophorèse négative dans lequel la particule est attirée vers le minimum du champ électrique et qui correspond à une valeur négative de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Le troisième régime correspond à l'annulation de la force diélectrophorétique à la fréquence de coupure, fréquence à laquelle la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti s'annule. On constate également, que lorsque la conductivité du milieu de suspension est très élevée, la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti peut devenir négative sur une grande partie de la gamme de fréquence ce qui limite les possibilités de manipulation de la particule.

En résumé, la diélectrophorèse est un phénomène électrodynamique qui dépend de la taille et des propriétés des particules à manipuler, dont les effets décroissent de manière exponentielle lorsqu'on s'éloigne des électrodes et qui dépend fortement de la fréquence du signal électrique.

3.3.1.2 La force d'électroconvection

L'application d'un champ électrique sur un fluide crée des forces de volume qui mettent le liquide en mouvement. L'expression de ces forces (equation (3.6)) a été élaborée par Stratton et Melcher [Melcher, 1981, Stratton, 1941].

$$\vec{f}_e = \rho \vec{E} - \frac{1}{2} |\vec{E}|^2 \nabla \varepsilon + \frac{1}{2} \nabla \left(\rho_m \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho_m} \right)_T |\vec{E}|^2 \right) \quad (3.6)$$

Où ρ et ρ_m sont les densités de charges et de masse.

Dans la partie de droite de cette équation, le premier terme correspond à la force de Coulomb qui est la force électrique agissant sur les charges libres au sein du liquide. Il est généralement prépondérant vis-à-vis des deux suivants [Ramos et al., 2005]. Le second terme est appelé force diélectrique et représente une force de polarisation du liquide. L'amplitude de cette force est en général inférieure de deux décades à la force de Coulomb [Atten, 1969]. Le troisième terme est la pression d'électrostriction. Si l'on considère que notre fluide est incompressible, cette force est alors le gradient d'un scalaire et elle est donc nulle. Si l'on considère que les perturbations du champ électrique dues aux forces de Coulomb et diélectrique sont petites, on peut réécrire l'équation (3.6) en faisant apparaître les gradients de la permittivité et de la conductivité (cf. équation (3.7)).

$$\begin{aligned} \langle \vec{F}_{ete} \rangle &= -0.5 \left[\frac{\varepsilon_m \left(\frac{\nabla \sigma_m}{\sigma_m} - \frac{\nabla \varepsilon_m}{\varepsilon_m} \right) \vec{E}^2}{1 + \left(\omega \frac{\varepsilon_m}{\sigma_m} \right)^2} + 0.5 \nabla |\vec{E}|^2 \nabla \varepsilon_m \right] \\ &= 0.5 \varepsilon_m \nabla T \vec{E}^2 \Pi(\omega) \end{aligned} \quad (3.7)$$

$$\text{où } \Pi(\omega) = \left(\frac{\alpha - \beta}{1 + \left(\omega \frac{\varepsilon_m}{\sigma_m} \right)^2} - \frac{\alpha}{2} \right)$$

Les gradients de permittivité et de conductivité sont directement liés à des gradients de température [Castellanos, 1998] par les expressions (3.9) et (3.10) :

$$\nabla \varepsilon = \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial T} \right) \nabla T \quad (3.8)$$

$$\nabla \sigma = \left(\frac{\partial \sigma}{\partial T} \right) \nabla T \quad (3.9)$$

En introduisant ces dépendances (équation (3.8) et (3.9)) dans l'équation (3.7), on fait apparaître deux termes : α et β (équation (3.10) et (3.11)) dont les valeurs pour des électrolytes aqueux sont $\alpha = -0.4\%/^{\circ}\text{K}$ et $\beta = +2\%/^{\circ}\text{K}$ [Lide, 2000]. Les gradients de conductivité et de permittivité induisent des mouvements de charges mobiles au sein du liquide qui, par friction, entraîne le déplacement des molécules du liquide. Plus le liquide sera conducteur, plus il y aura de charges mobiles et plus important seront les mouvements du liquide.

$$\alpha = \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial T} \right) \nabla T \quad (3.10)$$

$$\beta = \left(\frac{\partial \sigma}{\partial T} \right) \nabla T \quad (3.11)$$

La Figure 3.5 montre l'évolution du facteur $\Pi(\omega)$ en fonction de la fréquence pour trois conductivités électrique du fluide. Ce facteur est calculé à partir de l'expression de l'équation (3.7). Selon le signe de $\Pi(\omega)$, le sens des vortex du fluide au dessus des électrodes change. Ce changement de sens intervient à plus haute fréquence lorsque la conductivité électrique du milieu augmente. De plus, ce changement de signe s'accompagne d'une diminution de l'amplitude de $\Pi(\omega)$, ce qui signifie que la force d'électroconvection est plus faible à haute fréquence.

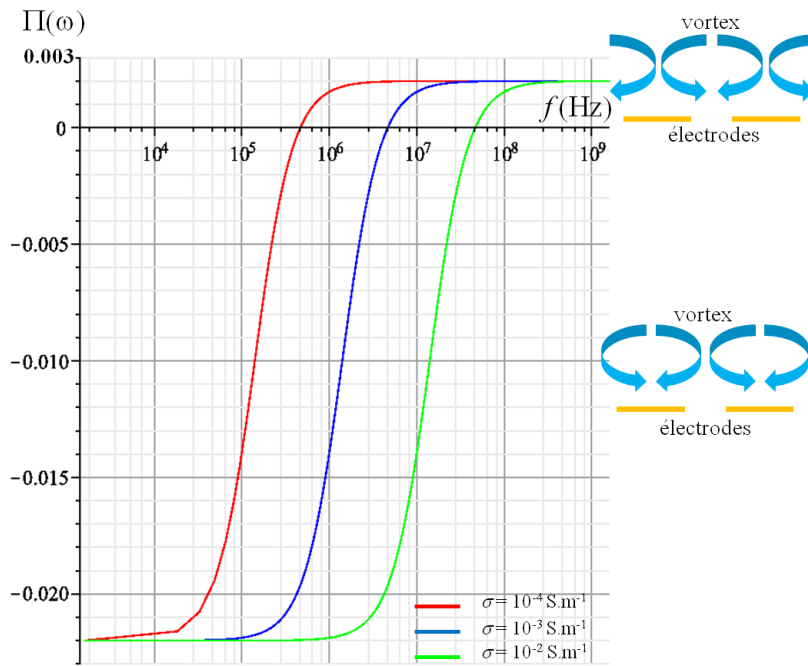


Figure 3.5 : Graphique du facteur $\Pi(\omega)$ en fonction de la fréquence pour trois conductivités électriques du milieu : 0.0001, 0.001 et 0.01 S/m. Ce facteur est calculé à partir de l'expression de l'équation (3.7).

En résumé, la force d'électroconvection est fortement dépendante de la conductivité du milieu ($> 10^{-3} \text{ S/m}$) et peut donner naissance à des vitesses importantes du fluide (mm/s) pour une large gamme de fréquence du signal AC. Dans le cas d'électrodes coplanaires, ces mouvements de liquide sont des tourbillons (vortex) localisés au dessus des électrodes.

3.3.1.3 La force électro-osmotique

La force électro-osmotique est l'effet d'un champ électrique sur la couche électrique située à l'interface entre une surface chargée et un électrolyte. Cette couche contient des ions présents dans l'électrolyte qui compensent la charge surfacique. Cette couche électrique est constituée de deux sous-parties, une couche fortement en interaction avec les charges de surface (dite couche de Stern [Stern, 1924]) et une couche plus éloignée de la surface, dite couche diffuse (figure 3.6).

Le modèle de Gouy-Chapman [Gouy, 1910, Chapman, 1913] décrit l'évolution du potentiel électrique au travers de cette couche électrique dans la direction normale à l'interface. La valeur de ce potentiel à l'interface entre les couches de Stern et diffuse est appelée potentiel zeta. La longueur de Debye (λ_d) caractérise l'épaisseur de cette double couche. Le tableau 3.1 donne des valeurs de la longueur de Debye pour différents couples surface/électrolyte. Si on applique un champ électrique dans une direction parallèle à l'interface, on va mettre en mouvement les charges présentes dans la double couche. Ce déplacement de charges va entraîner un mouvement du liquide par friction (figure 3.7).

De nombreux travaux [Ramos et al., 1999a, Green et al., 2000b, Gonzalez et al., 2000, Green et al., 2002] ont mis en évidence et modélisé ce phénomène. Dans le cas d'électrodes coplanaires (figure 3.7), la polarisation appliquée induit une charge sur l'électrode et un champ électrique tangentiel non-uniforme. A chaque demi-période, la charge et la direction du champ électrique tangentiel changent de signe, mais la force agissant sur la particule reste dans la même direction. La vitesse électro-osmotique du fluide, résultant du mouvement de la particule qui entraîne le fluide, dépend de la fréquence du signal électrique, de la conductivité du milieu et de la distance aux bords de l'électrode [Green et al., 2000b].

Une expression analytique de la vitesse électro-osmotique a été proposée par Gonzales et al. [Gonzalez et al., 2000]. L'établissement de cette expression repose sur une approximation linéaire de la chute de potentiel au niveau de la double couche (couche de Stern et couche diffuse). Pour un électrolyte composé de sels de KCl dissouts, la longueur de Debye peut s'écrire en fonction de la concentration molaire (c) en KCl (équation (3.12)).

En introduisant une fréquence non-dimensionnelle Ω (équation (3.13)) où x est la distance au centre du système, la chute de potentiel au travers de la double couche électrique est donnée

par l'équation (3.14). A partir de ces trois équations, on obtient l'expression de la vitesse électro-osmotique moyenne suivant la direction horizontale Ox (équation (3.15)). Un exemple de calcul de cette vitesse est donné à la figure 3.7.b où le maximum de vitesse est obtenu à une fréquence de 200Hz environ. La figure 3.7.c est une photographie d'une expérience de déplacement de liquide par électro-osmose [Morgan & Green, 2003].

$$\lambda_d = 1.764 \times 10^{-11} \sqrt{\frac{T}{c}} = \frac{0.3 \times 10^{-9}}{\sqrt{c}} \text{ à } T = 295K \quad (3.12)$$

$$\Omega = \frac{\omega \varepsilon \pi x}{2\sigma \lambda_d} \quad (3.13)$$

$$V_d = \frac{V}{2(1 + i\Omega)} \quad (3.14)$$

$$v_{eoo} = \frac{\varepsilon V^2}{8\eta x} \frac{\Omega^2}{(1 + \Omega^2)^2} \quad (3.15)$$

Où x est la distance au centre de l'espace inter-électrodes.

L'expression de v_{eoo} ici présentée est la forme la plus simple du modèle. En effet, l'effet de la couche de Stern n'est pas pris en compte. Dans le modèle complet, celui-ci est inclus dans un facteur pondérateur intervenant dans l'expression de v_{eoo} et de Ω . Ce facteur vaut 1 dans notre étude. Nous avons fait ce choix car notre objectif n'est pas de simuler l'effet électro-osmotique, mais de l'intégrer dans la simulation en 2D pour en évaluer son impact en fonction des paramètres géométriques des électrodes. Par conséquent, par souci de simplification, nous avons fait le choix de considérer l'expression la plus simple de v_{eoo} , et nous avons fixé la valeur de λ_d à 1nm dans les simulations numériques en 2 dimensions. Dans les simulations 2D, la vitesse électro-osmotique est une condition limite au niveau des électrodes. Elle représente la vitesse du fluide au niveau de la surface des électrodes.

Liquide	Conductivité (S/m)	λ_d (nm)
Electrolyte	10^{-1}	~ 3
Eau déionisée	10^{-1}	~ 80
Acétone (organique)	10^{-1}	~ 500

Tableau 3.2 : Longueur de Debye pour différents électrolytes.

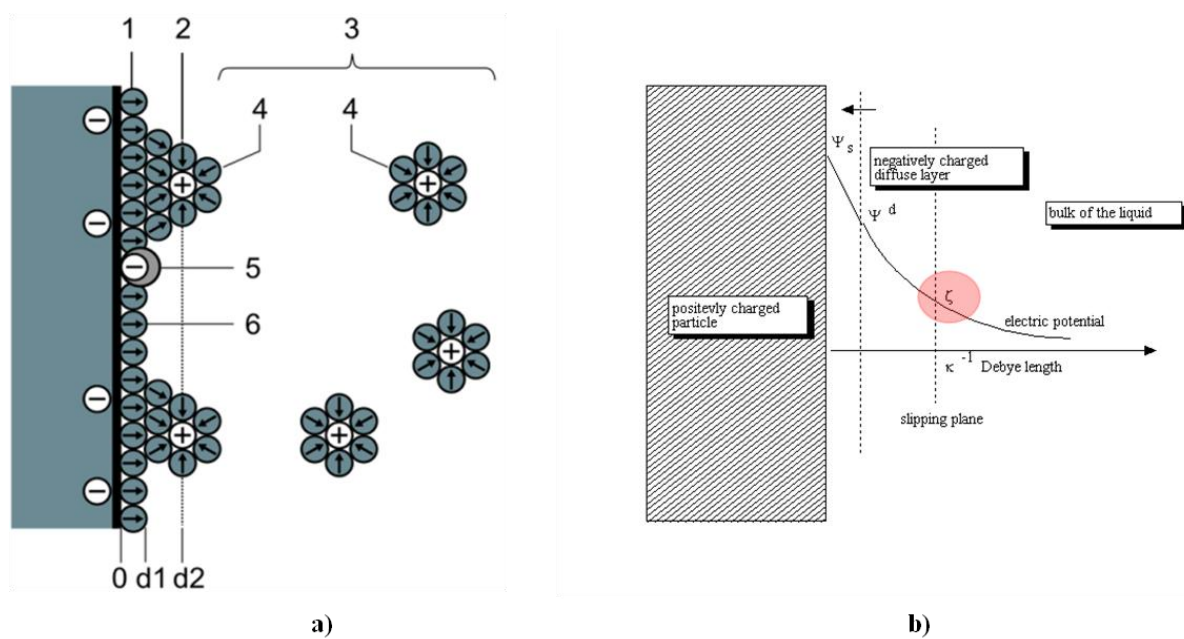


Figure 3.6 : Description schématique de l'interface entre une surface chargée et un électrolyte : a) répartition des charges, b) variation du potentiel électrique dans la direction normale à la surface.

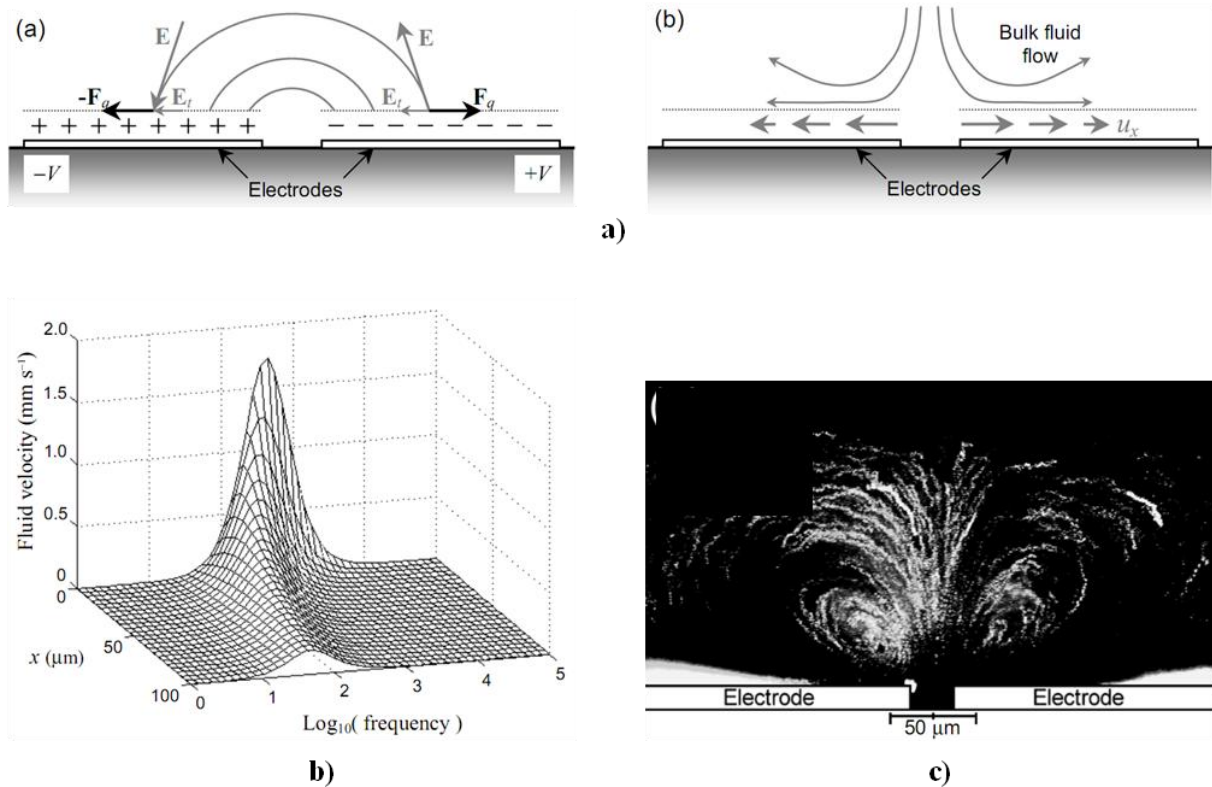


Figure 3.7 : aa) Vue schématique du principe de l'électroosmose AC : ab) l'interaction du champ électrique tangent à la surface des électrodes et des charges surfaciques de la double couche donne naissance à une vitesse surfacique et un mouvement général du liquide [Morgane 2003], b) Flux de liquide induit par électroosmose à la surface d'une électrode en fonction de la distance au centre du système et de la fréquence du signal électrique. La différence de potentiel est de 1V dans de l'eau déionisée et les électrodes coplanaires sont séparées de 25 microns [Morgan & Green, 2003], c) Photographie de lignes de courant obtenue par superposition successive d'images de déplacements de particules mises en mouvement par électro-osmose à une fréquence de 200Hz et une conductivité de 2,1 mS/m.

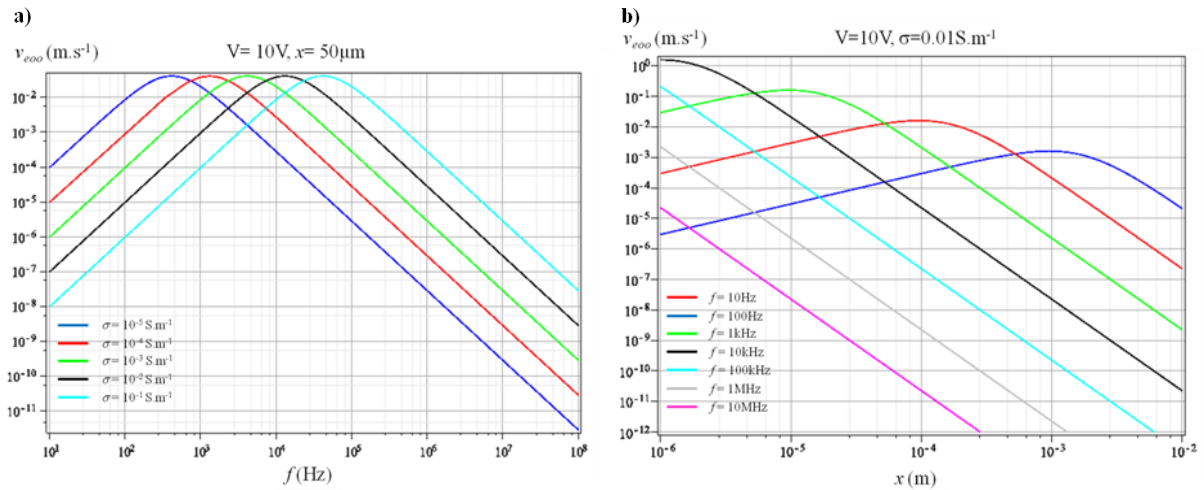


Figure 3.8 : Vitesse électro-osmotique tracée à partir de l'équation (3.15) : a) en fonction de la fréquence pour différentes conductivités du milieu / b) en fonction de la distance caractéristique du système pour différentes fréquences. La valeur de la longueur de Debye est le résultat de l'équation (3.12)

La figure 3.8 donne les représentations graphiques de la vitesse électro-osmotique en fonction de la fréquence pour différentes conductivités, et en fonction de la distance au centre x pour différentes fréquences. Si la conductivité électrique du milieu augmente, la vitesse électro-osmotique est maximum à plus hautes fréquences (jusqu'à 100kHz) (figure 3.8.a). Pour des distances entre électrodes supérieures à $100\mu\text{m}$, une conductivité électrique du milieu de 0.01S/m et une tension appliquée de 10 Volts, la vitesse électro-osmotique est inférieure au $\mu\text{m/s}$ pour des fréquences supérieures à 100kHz (figure 3.8.b). Cette figure donne une idée de l'évolution de la vitesse électro-osmotique en fonction de l'espace inter-électrodes, la conductivité électrique du milieu et la fréquence du signal dans le cas le plus simple. En prenant en compte la couche de Stern, il s'avère que la vitesse électro-osmotique diminue avec la conductivité du milieu [Gonzalez et al., 2000].

En résumé, l'électro-osmose est un phénomène électrodynamique qui génère des vitesses de déplacement de particules importantes (de l'ordre du millimètre par seconde), qui est plus important à faible conductivité ($< 10^{-2} \text{ S/m}$) et faible fréquence ($< 5\text{kHz}$).

3.3.2 Autres forces

3.3.2.1 La force de gravité, la poussée d'Archimède et le mouvement Brownien

Les particules colloïdales en suspension dans un électrolyte sont soumises à la force de gravité et à la poussée d'Archimède dont le bilan total est exprimé ci-dessous.

$$\vec{F}_{grav} = \frac{4}{3}\pi r^3(\rho_p - \rho_m)\vec{g} \quad (3.16)$$

De plus, en raison de leurs faibles dimensions, ces colloïdes sont soumis au mouvement Brownien, caractérisé par un mouvement perpétuel et aléatoire. Ce phénomène est dû aux nombreuses collisions que subissent les particules avec les molécules de l'électrolyte. Le déplacement moyen des colloïdes et leur coefficient de diffusion augmentent au fur et à mesure que leur taille diminue (figure 3.9).

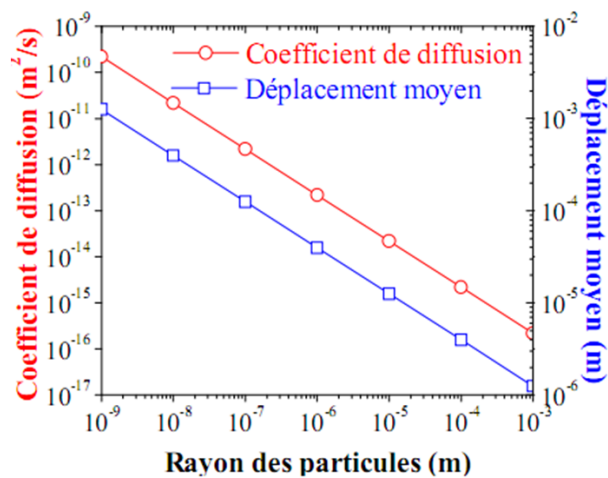


Figure 3.9 : Coefficient de diffusion et déplacement moyen en fonction de la taille des colloïdes pour des colloïdes soumis au mouvement brownien. Il s'agit de particules non-chargées dans de l'eau à 25°C [Pinedo-Rivera, 2009].

Dans une suspension de particules colloïdales non chargées, les colloïdes ne sont suspendus que si l'effet de la gravité est faible par rapport au mouvement Brownien. Dans le cas contraire, les particules sédimentent. Il existe une taille critique de colloïdes en dessous de laquelle la sédimentation n'a pas lieu. Afin de déterminer cette taille critique, on compare la vitesse de sédimentation de la particule avec la vitesse moyenne due au mouvement Brownien. Cette vitesse moyenne est donnée par l'équation (3.17). La vitesse de sédimentation est déterminée en écrivant l'équilibre des forces sur la particule en sédimentation (équation 3.18). De manière développée, cet équilibre est donné par l'équation (3.19) et la vitesse de sédimentation est donnée par l'équation (3.20). La taille critique (R_c) de la particule pour laquelle ces deux vitesses sont égales est enfin obtenue (équation 3.21).

$$v_B = \frac{3}{2} \left(\frac{k_b T}{\pi \rho_p r^3} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.17)$$

$$F_g = F_A + F_f \quad (3.18)$$

$$\frac{4}{3} \pi r^3 \Delta \rho g = 6 \pi \mu r v_{sed} \text{ où } \Delta \rho = \rho_p - \rho_m \quad (3.19)$$

$$v_{sed} = \frac{2 \Delta \rho g r^2}{9 \mu} \quad (3.20)$$

$$R_c \approx \left(45.5 \frac{k_b T \mu^2}{\pi \rho_p \Delta \rho^2 g^2} \right)^{\frac{1}{7}} \quad (3.21)$$

Le tableau 3.3 rassemble quelques valeurs de rayon critique de sédimentation pour différents matériaux dans l'eau.

Matériau	ρ ($\times 10^3 \text{kg/m}^3$)	R_c (μm)
Au	19.3	2
SiO ₂	2.2	5.5
Polystyrène	1.05	15

Tableau 3.3 : Valeurs du rayon critique de sédimentation à 25°C dans l'eau pour trois matériaux constituants de particules colloïdales.

En théorie, le mouvement Brownien doit être pris en compte lorsque la taille des particules est inférieure à ce rayon critique. Cependant, dans notre étude nous allons négliger cette composante dans notre bilan final des forces s'appliquant aux colloïdes. En effet, nous n'avons pas observé le mouvement Brownien pour des particules de tailles supérieures à 5 μm . Les particules de latex et les parasites employés lors de nos expériences ont sédimentés en l'absence de champ électrique. De ce fait, les forces dues au mouvement Brownien peuvent être négligées.

Remarque : Certaines études font mention que l'éclairage (en particulier pour des expériences sous microscope) participe à l'élévation de température du liquide et donc amplifie l'effet du mouvement Brownien [Green et al., 2001]. Nos observations expérimentales n'ont pas révélé ce phénomène.

En résumé, ces trois forces sont de l'ordre de 10^{-15}N pour le mouvement Brownien, 10^{-13}N pour la gravité et 10^{-14}N pour la poussée d'Archimède pour des particules de polystyrène de 1 micron de diamètre suspendues dans de l'eau. Les forces électrocinétiques que nous génèrons par un champ électrique alternatif et non-uniforme doivent posséder des intensités supérieures à ces valeurs pour que l'on puisse contrôler activement le mouvement des colloïdes en milieu liquide.

3.3.2.2 Force hydrodynamique

Le mouvement d'un liquide est caractérisé par son nombre de Reynolds. Il représente le rapport entre l'inertie et les effets de viscosité. Son expression est donnée par l'équation (3.22).

$$Re_y = \frac{\rho_m \cdot v \cdot l}{\mu} \quad (3.22)$$

Avec v la vitesse du liquide, l la dimension caractéristique du dispositif dans lequel se produit l'écoulement et μ la viscosité dynamique du liquide ($10^{-3} \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour l'eau).

L'écoulement est dit turbulent pour des valeurs supérieures à 2 000. En microfluidique, le nombre de Reynolds est souvent petit, ce qui implique que les écoulements sont laminaires. A titre d'exemple, pour l'eau, l'écoulement sera laminaire si la vitesse est de l'ordre du mm/s dans des canaux de largeur de l'ordre de la centaine de microns.

Lorsqu'une particule colloïdale est placée dans un flux laminaire, la loi de Stokes modélise la force hydrodynamique qui s'applique au colloïde. Cette loi est applicable pour des nombres de Reynolds inférieurs à 10. En considérant que le liquide se déplace à une vitesse v_f et le colloïde à une vitesse v_p , la force dite de 'trainée' qui s'applique au colloïde est (équation (3.23)):

$$\overrightarrow{F_{tra}} = k\mu(\overrightarrow{v_f} - \overrightarrow{v_p}) \text{ où } k \text{ est le facteur de forme du colloïde} \quad (3.23)$$

$$k = 6\pi r \text{ dans le cas d'une sphère}$$

A titre d'exemple, la force hydrodynamique d'entraînement dans la direction du flux est de l'ordre de 10^{-12}N pour une particule colloïdale (diamètre 1 micron) de polystyrène dans de l'eau.

Dans notre étude, la vitesse du liquide est le résultat de l'action des forces électrocinétiques. La vitesse du liquide est le résultat de l'action de ces forces sur le liquide. La vitesse électro-osmotique est une condition limite. Elle représente la vitesse du fluide au niveau des électrodes du fait de l'effet électro-osmotique.

3.3.2.3 Bilan des forces

Pour pouvoir prédire le mouvement de la particule colloïdale dans le liquide, il faut faire le bilan des forces s'appliquant sur la particule. Ces forces sont au nombre de trois : i) F_{dep} la force diélectrophorétique, F_{trai} est la force due à la combinaison des effets électrothermiques et électro-osmotiques, F_{grav} est le bilan de la force de gravité et de la poussée d'Archimède. Le bilan des forces en jeu dans le concentrateur est le suivant (équation 3.24):

$$\overrightarrow{F_{total}} = \langle \overrightarrow{F_{dep}} \rangle + \overrightarrow{F_{trai}} + \overrightarrow{F_{grav}} \quad (3.24)$$

Le calcul de la force diélectrophorétique demande de calculer la distribution du champ électrique sur le domaine d'expérimentation. Il faut donc résoudre une équation de conservation de la charge électrique (équation (3.25)) :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \overrightarrow{v_f}) + \nabla \cdot (\sigma \vec{E}) = 0 \quad (3.25)$$

Où $\rho \overrightarrow{v_f}$ est le courant électrique de convection (c'est-à-dire le courant électrique produit par le mouvement du liquide) et $\sigma \vec{E}$ est le courant de conduction. Le ratio des amplitudes de ces deux courants est appelé le nombre de Reynold 'électrique' [Castellanos, 1998]. Pour des valeurs numériques classiques des microsystèmes, le rapport entre ces deux contributions est de l'ordre de sept décades, c'est-à-dire que le déplacement de charges, par effet du champ électrique, est très largement supérieur au déplacement de charges par mouvement du liquide. Ceci indique que l'on peut résoudre l'équation de conservation de la charge électrique de manière indépendante de l'équation de conservation de la quantité de mouvement (équation de Navier-Stokes). Cela indique également que cette équation de conservation de la charge électrique peut se simplifier en une équation de Laplace. Cette équation pourra être résolue dans des conditions de quasi-statique (le signal est sinusoïdal et sa fréquence est au maximum de quelques Méga-Hertz).

Le calcul de la force de trainée demande de calculer les distributions du champ électrique, de la température et de la vitesse du liquide. Il faut donc résoudre, en plus de l'équation de Laplace, l'équation de conservation de l'énergie (équation (3.26)) :

$$\rho_m c_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho_m c_p \vec{v}_f \cdot \nabla T = k_T \nabla^2 T + \sigma |\vec{E}|^2 \quad (3.26)$$

Où c_p est la chaleur spécifique à pression constante, k_T est la conductivité thermique et $\sigma |\vec{E}|^2$ est le terme d'échauffement par effet Joule. Le terme de dissipation par effet de la viscosité peut-être négligé parce qu'il est inférieur de 10 décades au terme de dissipation par effet Joule [Castellanos, 1998]. Pour des fréquences suffisamment importantes, la dépendance temporelle de cette équation peut-être ignorée. Enfin, dans le cadre des microsystèmes, cette équation peut-être simplifiée encore un peu plus. En effet, comme indiqué précédemment, avec des valeurs numériques classiques des microsystèmes, on s'aperçoit que la diffusion de la chaleur est supérieure de trois décades à la convection. Par conséquent, le terme de convection de l'équation (3.26) peut être négligé et l'équation (3.26) devient :

$$k_T \nabla^2 T + \sigma E^2 = 0 \quad (3.27)$$

Lorsque le champ électrique est non uniforme, il existe alors des zones du fluide plus chauffées que d'autres. Il en résulte un gradient de température ∇T . Ce gradient de température provoque localement des variations de permittivité et de conductivité comme indiqué dans la section 2.1.2 (équations (3.8) et (3.9)).

Enfin, il faut résoudre l'équation de conservation de la quantité de mouvement (équation de Navier-Stokes). Etant donné les conditions d'utilisation des microsystèmes, on s'aperçoit que les variations de pression dans les liquides sont relativement faibles. Par conséquent, on peut considérer les liquides comme des liquides incompressibles (masse volumique constante). Finalement, comme l'écoulement est laminaire, les effets visqueux sont plus importants que les effets d'inertie est l'équation de Navier Stokes peut se simplifier à (équation (3.28)) :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = \rho \vec{F} - \overrightarrow{grad} P + \mu \Delta \vec{v}_f \quad (3.28)$$

où ρ est la masse volumique du liquide, \vec{F} est l'ensemble des forces de volume s'appliquant au liquide, μ est la viscosité dynamique du liquide, P est la pression et \vec{v}_f est la vitesse du fluide. La force de volume est la force d'électroconvection. On intègre l'effet de l'électro-osmose dans la résolution de cette équation en ajoutant une condition aux limites particulière à la surface des électrodes, qui consiste en une vitesse de glissement non-nulle et égale à la vitesse électro-osmotique moyenne (équation (3.15) – section 2.1.3). A partir du calcul de la vitesse \vec{v}_f issue de l'équation de Stokes (équation (3.28)), on peut calculer la force de trainée qui s'applique à la particule.

Enfin, le déplacement de la particule colloïdale peut être calculé en résolvant la relation fondamentale de la dynamique (2nd loi de Newton, équation (3.29)) :

$$m \frac{d\vec{v}_p}{dt} = \vec{F}_{totale} \text{ où } \vec{F}_{totale} = \sum \vec{F} \quad (3.29)$$

où m est la masse de la particule, \vec{v}_p est la vitesse de la particule et \vec{F}_{totale} est la somme des forces qui s'appliquent à la particule.

3.4 Les simulations par éléments finis

Nous avons réalisé une modélisation numérique des phénomènes décrits dans la section précédente pour prédire les effets de différents paramètres sur le mouvement des particules colloïdales dans le concentrateur. Cette modélisation est réalisée en utilisant la méthode des éléments finis (logiciel COMSOL MULTIPHYSICS version 3.5a).

La littérature scientifique fait référence à un travail très proche utilisant une modélisation numérique par éléments finis en deux dimensions mais sur des géométries assez différentes [Oh et al., 2009]. Nous avons également commencé notre travail par une approche en deux dimensions (2D). Les objectifs de cette approche 2D sont : i) la compréhension du phénomène (ordre de grandeur des différentes forces), ii) la mise en œuvre de routines de calcul afin d'automatiser la génération des fichiers de simulation et l'exploitation des résultats afin de pouvoir tester un très grand nombre de géométries (100 géométries). Les avantages de cette approche 2D sont : i) des temps de simulation courts et ii) une intégration simple de l'effet de l'électro-osmose dans les simulations. Cependant, ce modèle 2D ne permet pas de prédire les mouvements des colloïdes dans le sens de la longueur des électrodes puisque les électrodes ne sont pas parallèles. Il est donc absolument nécessaire d'avoir recours à des simulations tridimensionnelles. L'analyse 3D approche de manière plus réaliste la réalité physique du microsystème de concentration. Elle permet de prédire le comportement concentrateur et de choisir les géométries potentiellement intéressantes. Cependant, le calcul est coûteux en ressources (temps de calcul, mémoire), ce qui empêche d'étudier des géométries de grande taille. En résumé, le modèle 2D permet de sélectionner une gamme de paramètres favorable à la concentration. Le modèle 3D donne une information sur les mouvements de grande ampleur au sein du réservoir. Ainsi, en combinant les deux approches, il est possible de prédire le pouvoir concentrateur d'une géométrie sur des surfaces de réservoir très importantes (longueur de l'ordre du cm).

3.4.1 Plateforme de simulation

La simulation numérique par éléments finis est effectuée à l'aide du logiciel COMSOL MULTIPHYSICS® version 3.5a, couplé à MATLAB® version 7.7 (R2008B). MATLAB permet d'automatiser la création des fichiers de simulation et l'exploitation des résultats. La machine de calcul est une machine biprocesseurs (AMD), bi-cœurs cadencée à 2,4Ghz possédant 8G de RAM et deux disques en RAID1 logiciel de 250G. Le système d'exploitation est REDHAT 4, 64bits.

Le tableau 3.4 donne les informations concernant le maillage par éléments de type 'simplexe' (triangle en 2D et tétraèdre en 3D). Nous avons utilisé des éléments isoparamétriques avec une interpolation quadratique entre chaque nœud physique. Les simulations ont été réalisées sur un espace multiparamétrique comprenant 3 conductivités, 100 géométries (en faisant varier la largeur (w) et l'espacement (e) des microélectrodes de 10 à 100 μm par pas de 10 μm et même dans certain cas de 10 à 200 μm , 30 fréquences et 2 tensions différentes. Ceci représente 18 000 simulations qui ont ensuite été analysées.

Modèle	Nombre d'éléments	
	Minimum	Maximum
2 dimensions	171	229
3 dimensions	11385	25000

Tableau 3.4 : Nombres d'éléments finis minimums et maximums utilisés dans les simulations en fonction du modèle (2D ou 3D).

En 2D, l'automatisation de la génération du fichier de simulation permet, pour une valeur de e , de réaliser une boucle sur les fréquences (au nombre de 30) pour 10 valeurs de w allant de 10 à 100 μm par pas de 10 μm . Le temps de calcul moyen est de 5 minutes. Le calcul est répété pour 3 conductivités électriques, 2 tensions et 10 valeurs de e . Le temps de calcul total est de 5 heures. En 3D, une simulation pour une géométrie, une fréquence, une conductivité, une tension électrique demande en moyenne 15 minutes. Quinze nouvelles minutes sont nécessaires pour 'postprocesser' les résultats et générer les courbes graphiques des différentes forces (électroconvection, diélectrophorèse et totale). Dix-huit géométries ont été étudiées, ce qui équivaut à un temps de calcul total de 45 heures.

3.4.2 Construction des modèles 2D et 3D

La simulation par éléments finis demande de définir une géométrie et de découper cette géométrie en éléments finis (triangle en 2D et tétraèdre en 3D). La figure 3.10 donne les paramètres de la géométrie du modèle 2D ainsi que le maillage. Les microélectrodes sont espacées d'une distance e (écart inter-électrodes), et possède une largeur w . La hauteur du domaine de simulation est fixée à 200 microns et la largeur est égale à deux fois la somme de l'espacement inter-électrodes et de la largeur de l'électrode. Les conditions aux limites sont au nombre de trois en fonction de leur position dans le domaine géométrique de simulation. Le maillage du domaine apparaît en gris sur la figure.

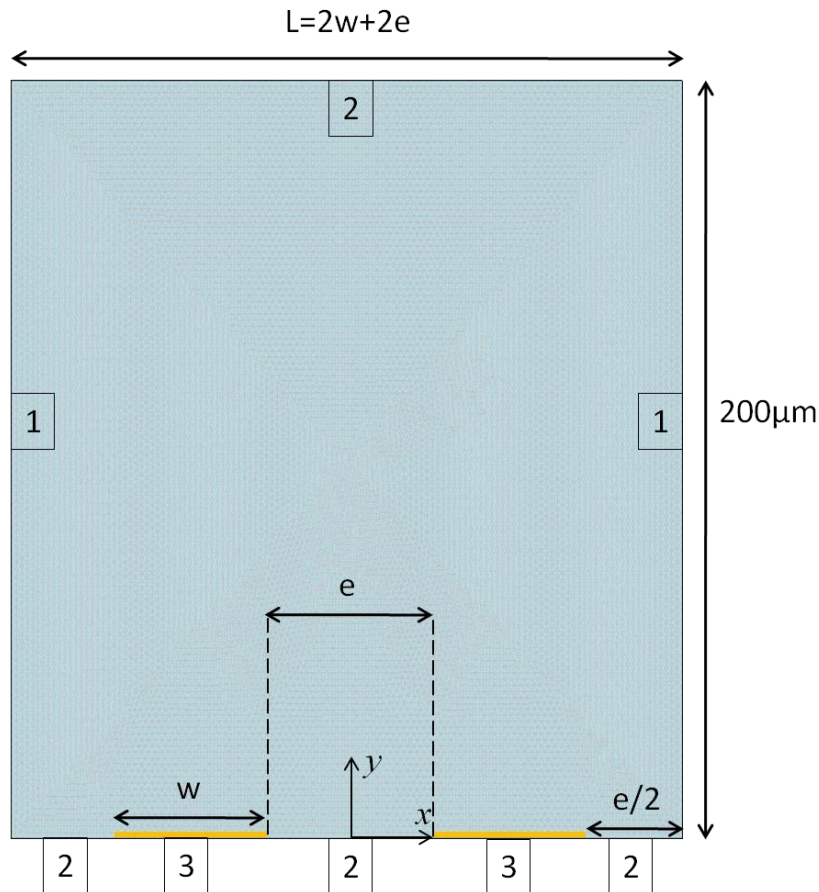


Figure 3.10 : Domaine de simulation 2D. Les microélectrodes sont espacées d'une distance e (écart inter-électrodes), et possède une largeur w . La hauteur du domaine de simulation est fixée à 200 microns et la largeur est égale à deux fois la somme de l'espacement inter-électrodes et de la largeur de l'électrode. Les électrodes n'ont pas d'épaisseur. Les conditions aux limites sont au nombre de trois en fonction de leur position dans le domaine géométrique de simulation. Le maillage du domaine apparaît en gris sur la figure.

La figure 3.11 donne les paramètres de la géométrie du modèle 3D ainsi que le maillage. Les microélectrodes sont espacées d'une distance e (écart inter-électrodes), et possède une largeur w au centre de la figure. Différentes géométries d'électrode sont étudiées. La hauteur du domaine de simulation est fixée à 200 microns et la largeur est égale à L (cf. figure 3.10). Les conditions aux limites sont au nombre de trois en fonction de leur position dans le domaine géométrique de simulation. Le maillage du domaine apparaît en gris sur la figure.

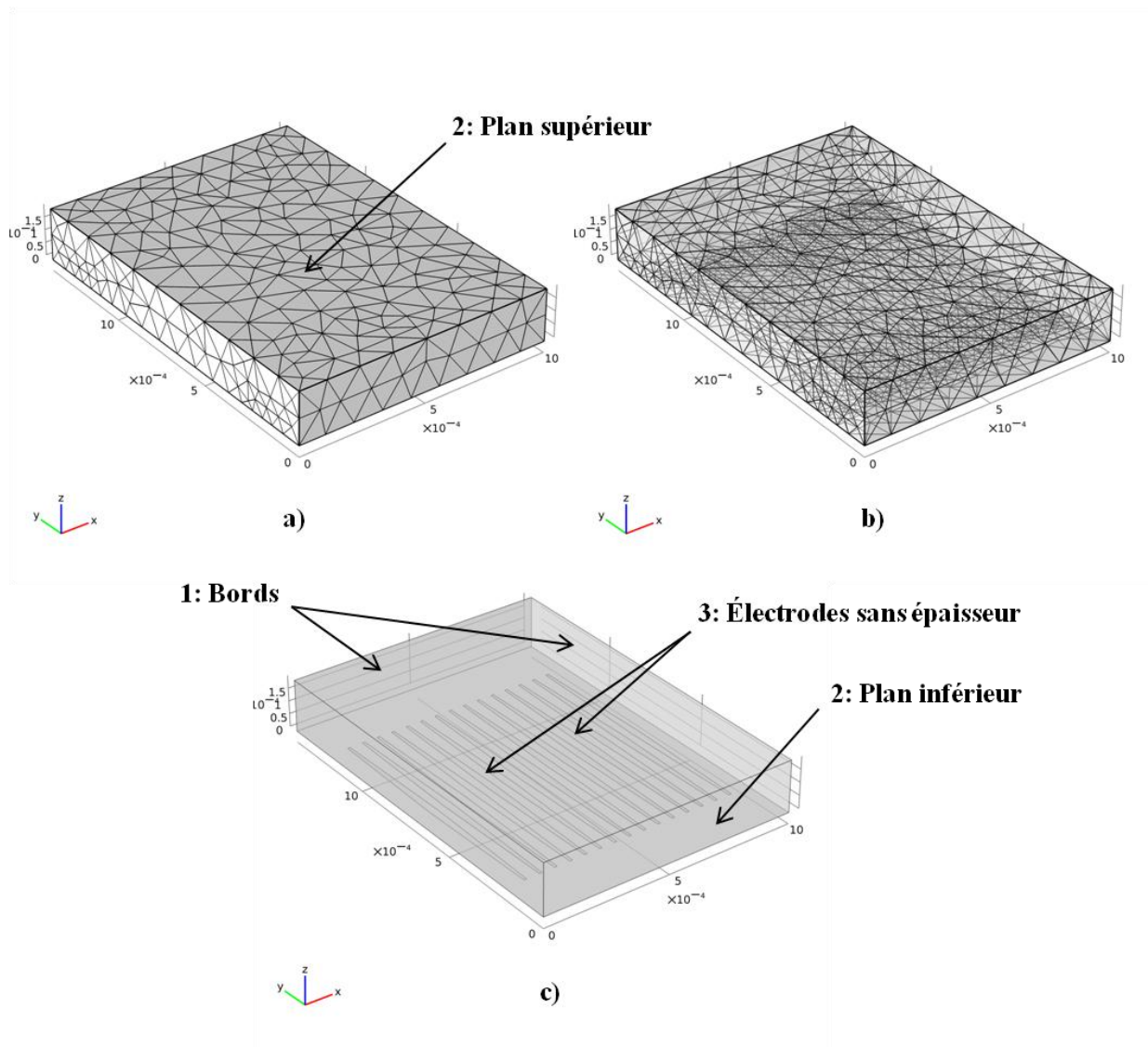


Figure 3.11 : Représentations du domaine 3D. Les microélectrodes (en c)) sont espacées d'une distance e (écart inter-électrodes de $30\mu\text{m}$ sur la figure), et possède une largeur w (de $30\mu\text{m}$ sur la figure) au niveau du centre. Différentes géométries d'électrode sont étudiées. La hauteur du domaine de simulation est fixée à $200\mu\text{m}$ et la largeur est égale à 1mm . Les conditions aux limites sont au nombre de trois en fonction de leur position dans le domaine géométrique de simulation. Le maillage du domaine apparaît sur la figure dans une représentation pleine (a) et transparente (b).

La figure 3.12 liste les géométries (vue de dessus) des microélectrodes qui ont été simulées dans le cadre de la modélisation en trois dimensions.

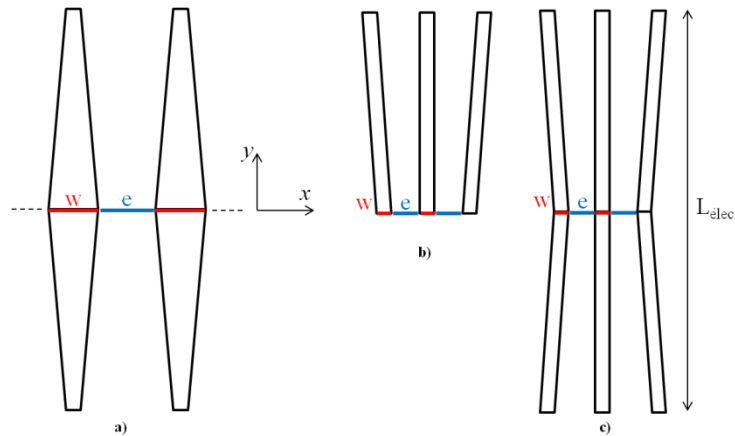


Figure 3.12 : Vue schématique des géométries des microélectrodes incorporées dans les simulations en trois dimensions.

L'étape suivante dans la construction des modèles est le choix des équations différentielles à résoudre sur les géométries présentées ci-dessus. Comme expliqué dans la section 2 de ce chapitre, le problème physique que nous étudions demande de résoudre trois équations : i) électrostatique, ii) transfert de chaleur, iii) écoulement de Stokes. Ces trois équations sont résolues de manière découplée comme cela a été justifié dans la section 2. Pour chacun de ces trois calculs, il faut définir des conditions aux limites.

Le tableau 3.5 récapitule ces conditions aux limites pour la simulation en deux dimensions. Pour l'équation de Laplace, les parois notées 1 sur la figure 3.10 ont une condition périodique afin de simuler le champ électrique créé par un réseau d'électrodes planaires qui se répètent à l'infini. Les parois notées 2 ont une condition de non présence de charges, ce qui se traduit par l'expression $\vec{n} \cdot \vec{D} = 0$ selon le formalisme de Maxwell et des conditions de passage à la surface de séparation de deux milieux. Les parois notées 3 correspondent aux électrodes auxquelles est appliquée une différence de potentiel V égale à Ve (Ve est le potentiel d'excitation, chacune des électrodes possède un potentiel égale à $Ve/2$). Pour le transfert de chaleur, une condition de flux normal à la paroi est appliquée afin de simuler un échange de chaleur au niveau des bords du domaine (notés 1 sur la figure 3.10). Cette condition se traduit mathématiquement par un flux de chaleur proportionnel à la différence de température entre le liquide et l'extérieur et le coefficient de transfert thermique (il traduit de manière empirique les échanges de chaleur de l'intérieur - ici le fluide - avec l'extérieur. Nous avons choisi une

valeur $h_T = 1000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \text{K}^{-1}$). Les parois notées 2 correspondent au fond du puits et au capot le recouvrant. Nous considérons que ces éléments sont parfaitement isolant (ce qui correspond à un flux de chaleur nul) afin de s'affranchir du problème de détermination de h_T . Les électrodes ont une température fixée à $T_{ext} = 295\text{K}$ car on considère qu'elles sont à l'équilibre thermique. Enfin, pour l'équation de Stokes, les parois notées 1 ont une condition de symétrie afin de respecter la symétrie du système (par conséquent, la vitesse du fluide n'a pas de composante normale au niveau de ces frontières). La vitesse au niveau des autres parois (notées 2 sur la figure 3.10) est nulle, ce qui correspond à une situation de non glissement du fluide. Au niveau des électrodes (notées 3), nous implémentons une vitesse de glissement. Cette vitesse correspond à la vitesse électro-osmotique dont l'expression est donnée par l'équation (3.15) de la section (3.3.1.3). Cette condition simule le mouvement du fluide causé par l'effet électro-osmotique généré par le champ électrique tangentiel à la surface des électrodes.

	Electrostatique	Transfert de chaleur	Ecoulement de Stokes
1	condition périodique	flux normal à la paroi $\vec{n} \cdot (k_T \nabla T) = h_T (T_{ext} - T)$	symétrie $\vec{n} \cdot \vec{v} = 0$
2	pas de charges $\vec{n} \cdot \vec{D} = 0$	isolation thermique $\vec{n} \cdot (k_T \nabla T) = 0$	non glissement $\vec{v} = \vec{0}$
3 (électrodes)	potentiel $V = \pm Ve/2$	température fixée $T = T_{ext} = 295\text{K}$	vitesse de glissement $v_{slip} = v_{eoo}$ (cf. équation (3.15))

Tableau 3.5 : Conditions aux limites appliquées à la simulation 2D pour chaque frontière du domaine définie à la figure 3.10. La condition v_{slip} est une superposition des trois composantes : $v_{slip}(x = 0)$, $v_{slip}(x = -w - e)$ et $v_{slip}(x = w + e)$ (cf. figure 3.13).

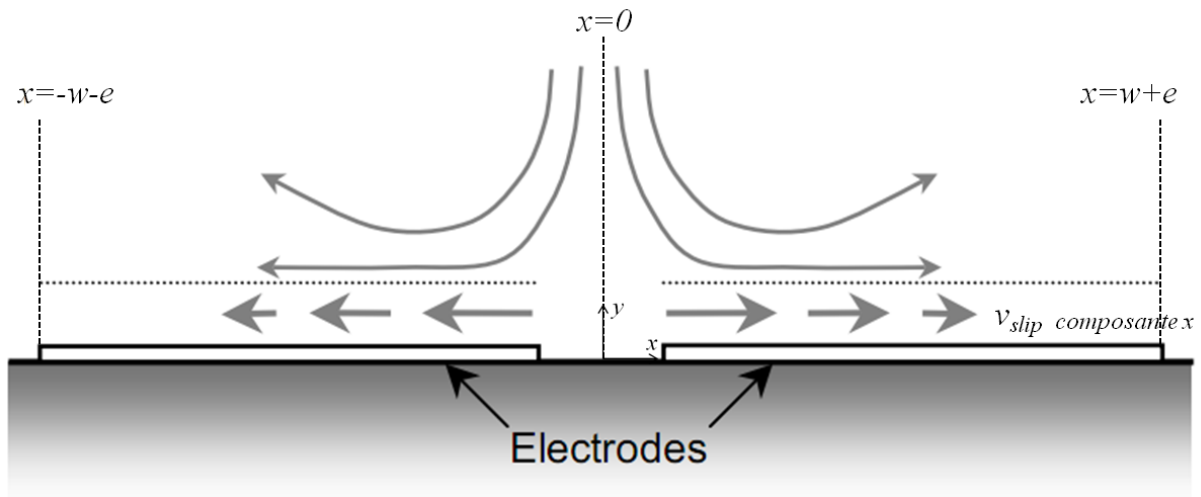


Figure 3.13 : Schéma de l'application de la vitesse de glissement au niveau des électrodes.

Le tableau 3.6 récapitule ces conditions aux limites pour la simulation en trois dimensions. Pour l'équation de Laplace, les bords du domaine et les plans supérieurs et inférieurs (cf. figure 3.11) ne sont pas chargés électriquement. Cette condition limite s'exprime par l'équation mathématique $\vec{n} \cdot \vec{D} = 0$. Chaque électrode possède alternativement un potentiel $+Ve/2$ et $-Ve/2$. Pour le transfert de chaleur, un échange de chaleur existe au niveau des bords du domaine. Il est modélisé par un flux normal à la paroi proportionnel au coefficient d'échange thermique h_T (la valeur de h_T est identique à celle employé dans la simulation 2D). Pour simplifier le problème, nous considérons que les plans supérieurs et inférieurs sont isolés thermiquement. Les électrodes n'échangent pas de chaleur avec le fluide, ce qui correspond à une valeur de flux nul. Enfin, pour l'équation de Stokes, les bords, les plans supérieurs et inférieurs et les électrodes possèdent une condition de non glissement du fluide, exprimée par une vitesse nulle sur ces limites. L'effet électro-osmotique n'est pas introduit dans la simulation 3D par souci de simplification.

	Electrostatique	Transfert de chaleur	Ecoulement de Stokes
1 : Bords	pas de charges $\vec{n} \cdot \vec{D} = 0$	flux normal à la paroi $\vec{n} \cdot (k_T \nabla T) = h_T (T_{ext} - T)$	non glissement $\vec{v} = \vec{0}$
2 : Plans inférieur et supérieur	pas de charges $\vec{n} \cdot \vec{D} = 0$	isolation thermique $\vec{n} \cdot (k_T \nabla T) = 0$	non glissement $\vec{v} = \vec{0}$
3 : électrodes	potentiel $V = \pm Ve/2$	flux nul $\vec{n} \cdot (k_T \nabla T) = 0$	non glissement $\vec{v}_{slip} = \vec{0}$

Tableau 3.6 : Conditions aux limites appliquées à la simulation 3D pour chaque frontière du domaine défini à la figure 3.11.

Nous verrons dans la suite de cette section que l'effet électro-osmotique perturbe les mouvements de concentration. Nous cherchons donc à nous placer dans des conditions de fonctionnement qui minimisent les effets d'électro-osmose. La simulation 2D nous a permis de définir ces conditions de fonctionnement. Par conséquent, lors des simulations en 3D, nous nous sommes placés dans ces conditions, ce qui a permis de ne pas intégrer ce phénomène.

3.4.3 Résultats des simulations 2D

Dans cette partie, nous exposons les résultats obtenus à partir des simulations numériques en 2D. La démarche de cette étude consiste à analyser l'influence des paramètres physiques (σ , V , f) et géométriques (e et w) sur les différentes forces électrocinétiques présentées au début de ce chapitre. L'objectif est de connaître la gamme de valeurs de ces paramètres qu'il est possible d'exclure de l'étude numérique en 3D. Dans un premier temps, nous étudions l'influence de ces paramètres sur la température, afin d'identifier les valeurs de paramètres jugées inacceptables (par exemple, un échauffement induisant des températures trop élevées pour des entités biologiques). Dans un deuxième temps, nous évaluons l'influence des paramètres, notamment de la géométrie sur l'effet électro-osmotique. Enfin, nous présentons l'influence des paramètres géométriques sur la hauteur de lévitation des particules colloïdales dans l'électrolyte. L'effet de la conductivité sur cette hauteur est également exposé. A l'issue de ces analyses, nous proposons une gamme de paramètres susceptible d'offrir les meilleures performances au concentrateur.

Nous avons effectué une série de simulations en faisant varier la largeur des électrodes (w) et l'espace inter-électrodes (e). La figure 3.14 est un exemple de résultats obtenus. Elle donne les cartes d'équivalents du champ électrique, de la température et de la vitesse de l'électrolyte pour l'une de ces géométries. Pour que les figures soient lisibles, et compte tenu de la gamme de valeurs des paramètres e et w (valeurs allant de 10 à 200 μm), nous choisissons de présenter la plupart des résultats pour des géométries d'électrodes dont les valeurs de e et w sont de 60 μm .

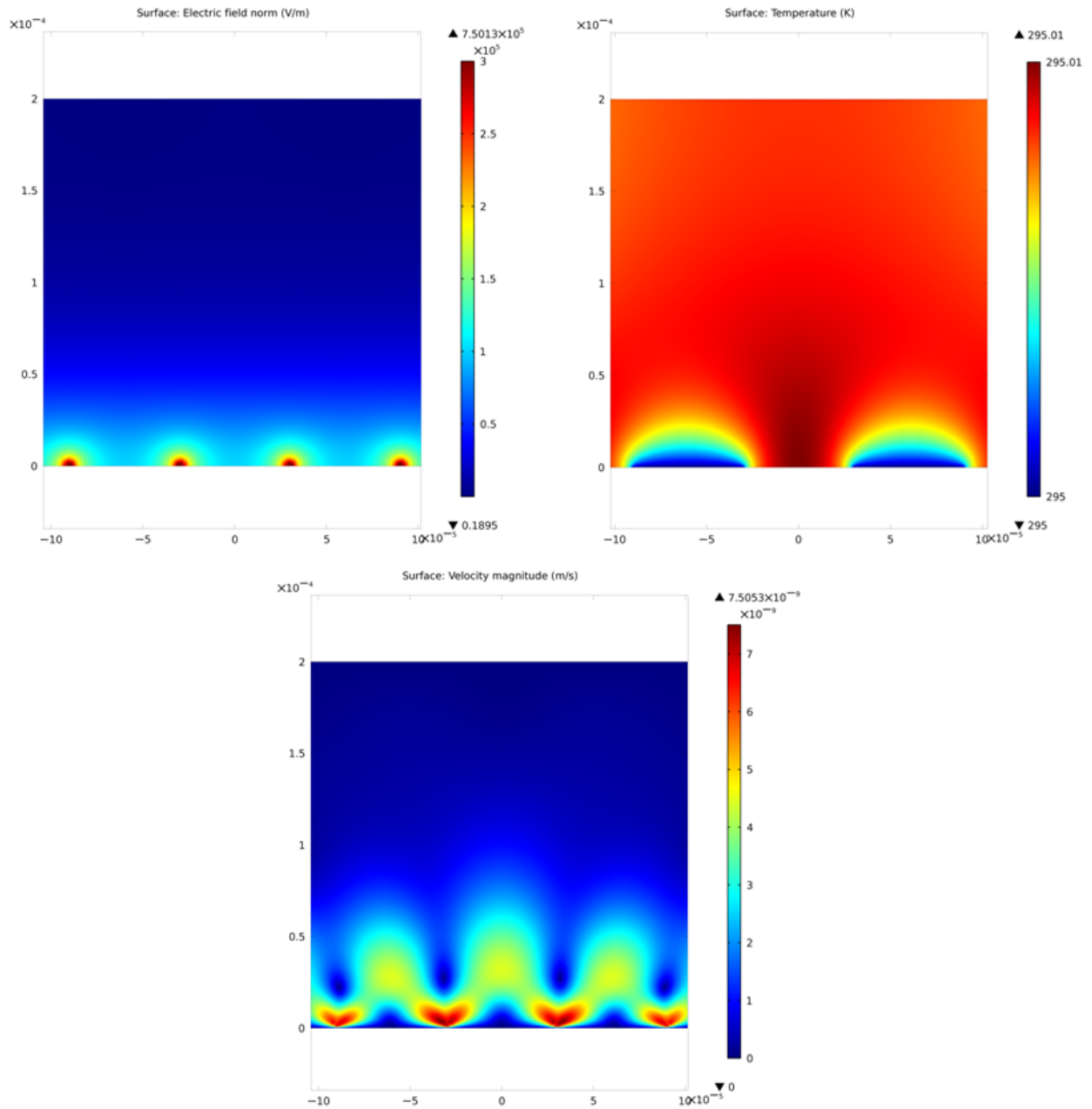


Figure 3.14 : Cartes d'équivalents du champ électrique, de la température et de la vitesse de l'électrolyte pour une configuration géométrique telle que $w=60\mu\text{m}$ et $e=60\mu\text{m}$. La conductivité électrique du liquide (équivalent à un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau) est fixée à 0.0001 S/m, la différence de potentiel électrique appliquée aux électrodes est de 10V et la fréquence du signal électrique AC est fixée à 100kHz.

3.4.3.1 Influence du couple (σ , V) et de la géométrie (e et w) sur la température

Les effets électrothermiques AC sont à la base du phénomène de concentration exploité dans ce travail. Les objets utilisés pour les applications de laboratoire sur puce sont généralement vivants, et donc supportent mal les températures élevées. De ce fait, il est absolument nécessaire de connaître la température du système lors de son fonctionnement.

L'échauffement est conditionné par la conductivité du milieu et l'amplitude de l'excitation. Dans notre cadre d'étude, il ne dépend pas de la fréquence car seul l'échauffement par effet Joule est pris en compte dans les simulations numériques. L'échauffement dépend de la fréquence si les pertes diélectriques sont prises en compte. Dans le cas de l'eau (permittivité relative de 80 en dessous de 10^8 Hz), ce phénomène est non négligeable pour des fréquences de l'ordre du gigahertz. Au-delà de la centaine de GHz, les dipôles permanents n'ont pas le temps de s'orienter avec le champ électrique et la permittivité relative de l'eau chute à 2.

La figure 3.15 montre la carte des valeurs de la température dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité électrique égale à 0,01S/m, et soumis à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 50 Volts appliqué aux microélectrodes. Le résultat est représenté pour des microélectrodes ayant une largeur de $60\mu\text{m}$ et un espacement inter-électrodes de $60\mu\text{m}$. Dans cette configuration, la température maximale est de 314K, soit 41°C .

La figure 3.16 est un graphique représentant la température moyenne dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique variant de 0,0001 à 0,01 S/m et soumises à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 10 ou 100 Volts appliqué aux microélectrodes en fonction du rapport entre l'espace inter-électrodes et la largeur des électrodes. La température moyenne est calculée sur le domaine de chaque géométrie simulée grâce à la fonction *mean* de COMSOL MULTIPHYSICS.

Le graphique montre que le couple de paramètre ($\sigma=0,01\text{S/m}$, $V=100\text{V}$) génère des températures supérieures à 400K quelque soit la configuration géométrique des microélectrodes. D'autre part, la température diminue lorsque l'espace entre les électrodes augmente et que la largeur des électrodes diminue.

Pour le couple de paramètres ($\sigma=0,001\text{S/m}$, $V=100\text{V}$), la température est inférieure à 313K (40°C) lorsque l'espace inter-électrodes est cinq fois plus grand que la largeur de l'électrode.

En résumé, la température est inférieure à 40°C lorsque le rapport e/w est supérieur à 5 pour le couple de paramètres ($\sigma=0,001\text{S/m}$, $V=100\text{V}$). Pour le couple de paramètres ($\sigma=0,01\text{S/m}$, $V=50\text{V}$), des zones du liquide s'échauffent jusqu'à 41°C pour une configuration ($e=w=60\mu\text{m}$). De ce fait, la suite de l'étude n'intègre pas l'emploi de tensions supérieures à 50V pour une valeur de conductivité électrique de $0,01\text{S/m}$.

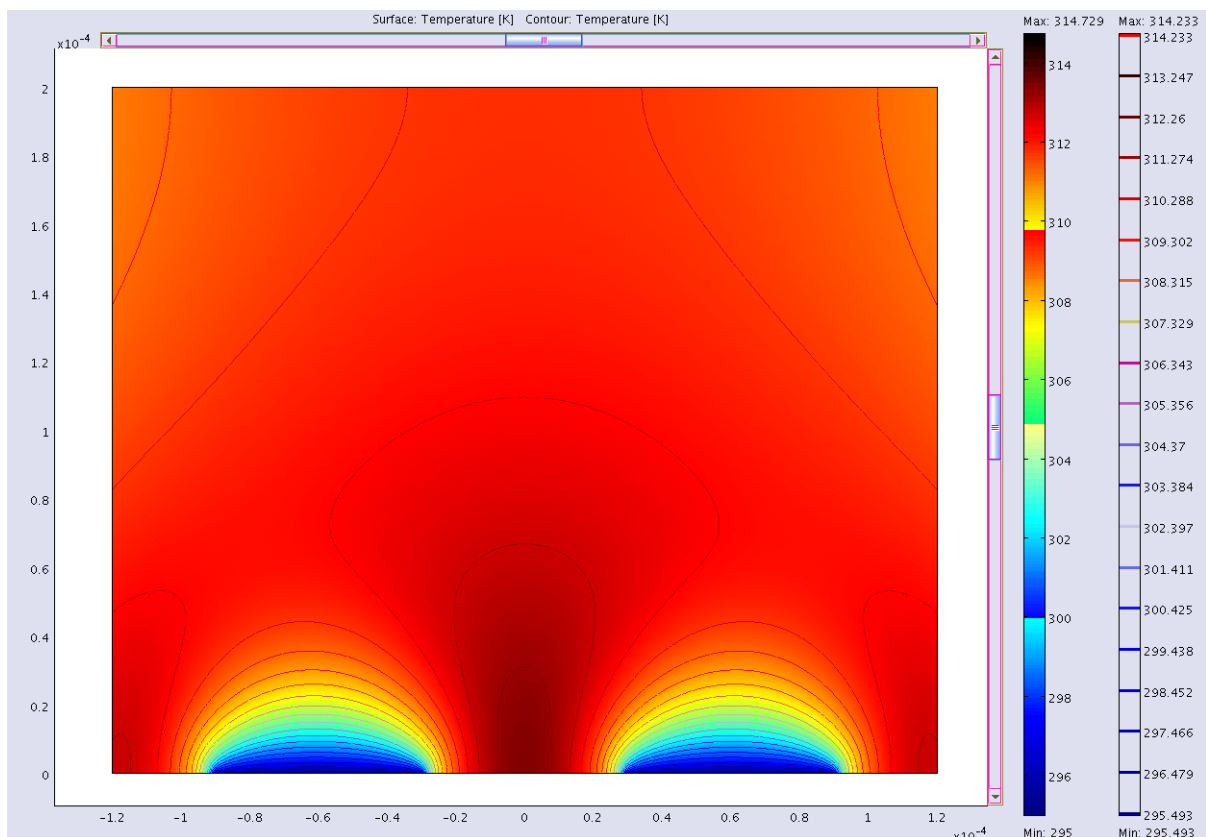


Figure 3.15 : Représentation surfacique de la température pour un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique égale à $0,01\text{ S/m}$ et soumis à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 50 Volts appliqué aux microélectrodes dont l'espace inter-électrodes et la largeur des électrodes sont égaux à $60\mu\text{m}$.

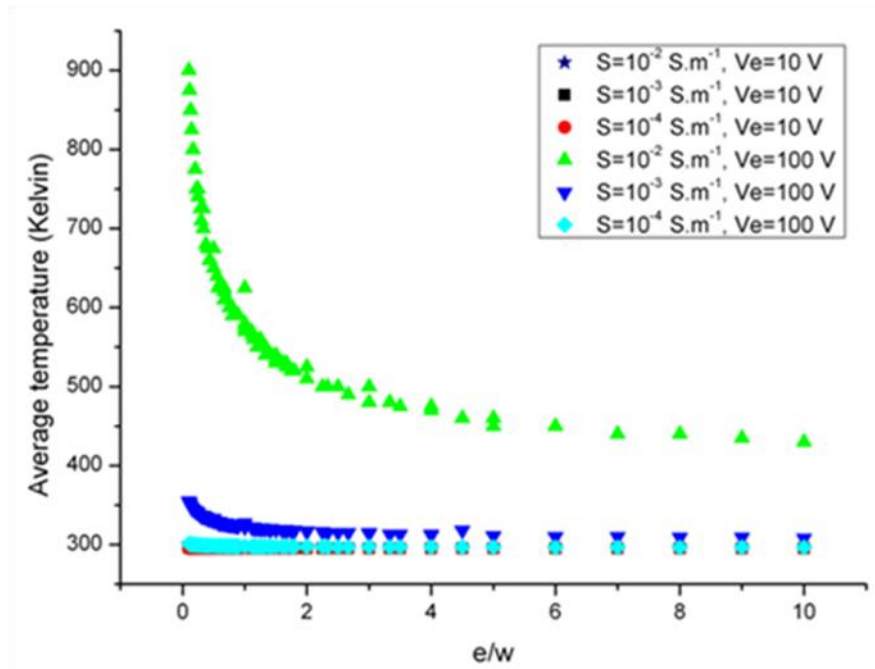


Figure 3.16 : Température moyenne dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique variant de 0,0001 à 0,01 S/m et soumis à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 10 ou 100 Volts appliqué aux microélectrodes en fonction du rapport entre l'espace inter-électrodes et la largeur des électrodes, extraite des simulations numériques par éléments finis (COMSOL MULIPHYSICS).

3.4.3.2 Influence de la fréquence du signal et de la géométrie (e et w) sur l'électro-osmose

L'effet électro-osmotique est intégré dans la simulation 2D sous la forme d'une condition limite au niveau des électrodes (figure 3.13). Ce phénomène dépend de la fréquence du champ électrique appliqué, mais aussi de la géométrie. La dépendance géométrique est symbolisée par x dans l'expression analytique de la vitesse électro-osmotique (équation 3.15)). Dans cette étude, x est l'équivalent de l'écart inter-électrodes e (la position $x=0$ est au centre du domaine de simulation).

La figure 3.17 montre la distribution spatiale des forces électrohydrodynamiques (dite de trainée) et de la force totale (diélectrophorèse, électro-osmose, électrothermie, gravité et poussée d'Archimède) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\varepsilon_p=2.5$) de diamètre égal à 5 microns suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0.0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 10Hz. La condition limite $v_{slip} = v_{eoo}$ est appliquée au niveau des électrodes.

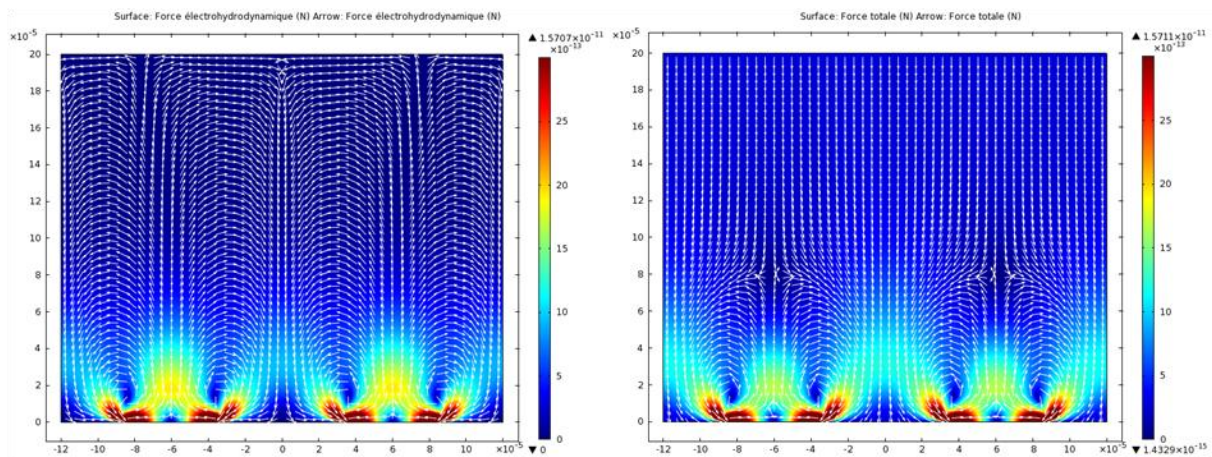


Figure 3.17 : Distribution spatiale des forces électrohydrodynamiques (dite de trainée) et de la force totale sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μm suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 10Hz. La condition limite $v_{slip} = v_{eoo}$ est appliquée au niveau des électrodes.

La distribution de la force totale présentée sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs, montre que l'électro-osmose domine tous les autres phénomènes lorsque la fréquence du signal est de 10Hz.

La figure 3.18 donne la distribution spatiale des forces électrohydrodynamiques (dite de trainée) et de la force totale sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans les mêmes conditions que la figure 3.17, mais la condition limite de vitesse électro-osmotique n'est pas appliquée. Par conséquent, l'effet électro-osmotique n'est pas pris en compte dans le calcul numérique de la force électrohydrodynamique.

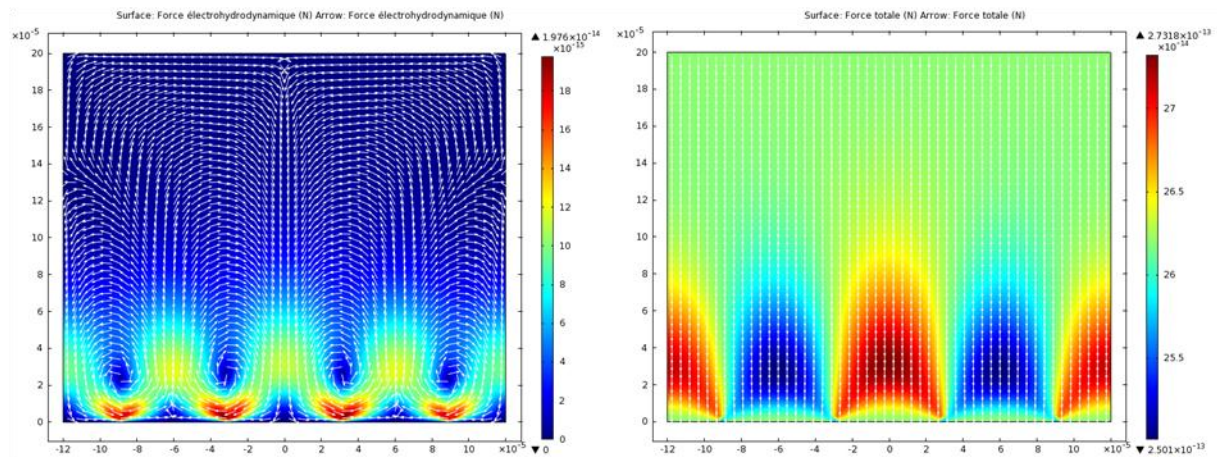


Figure 3.18 : Distribution spatiale des forces électrohydrodynamiques (dite de trainée) et de la force totale sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 10Hz. La condition limite $v_{slip} = v_{eoo}$ n'est pas appliquée.

La distribution de la force électrohydrodynamique de la figure 3.18 diffère de celle de la figure 3.17 au niveau de sa valeur maximale (de l'ordre de 10^{-16} N figure 3.17, contre 10^{-11} N figure 3.18) mais aussi de sa distribution sous forme de vecteurs. Dans le cas de la figure 3.18, la force électrohydrodynamique est représentative de l'effet électrothermique, et celui-ci est négligeable devant la force diélectrophorétique et la gravité, du fait de la conductivité électrique faible. La distribution de la force totale montre que la force de gravité domine la force diélectrophorétique.

La figure 3.19 donne la distribution spatiale des forces électrohydrodynamiques (dite de trainée) et de la force totale sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz. La condition limite $v_{slip} = v_{eoo}$ est appliquée au niveau des électrodes.

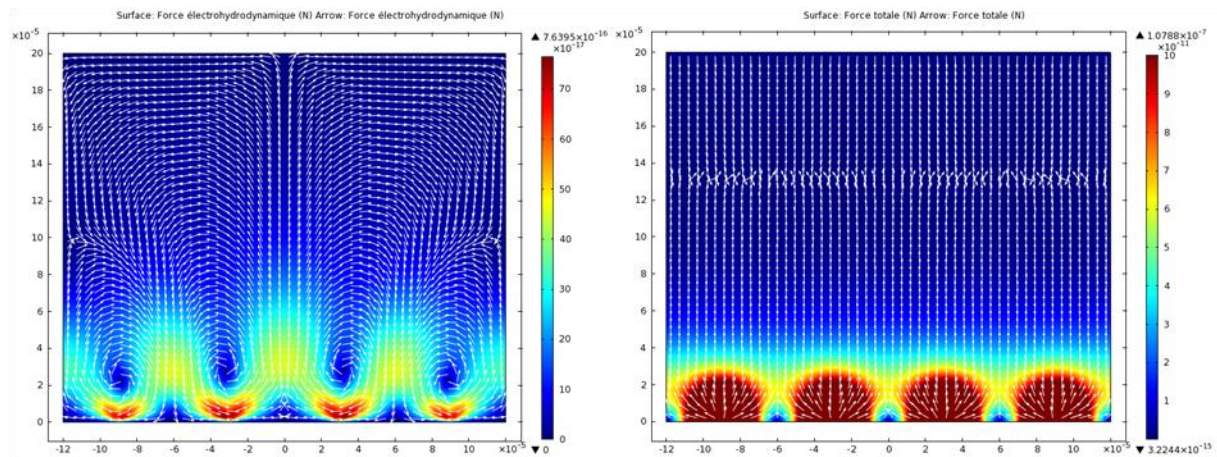


Figure 3.19 : Distribution spatiale des forces électrohydrodynamiques (dite de trainée) et de la force totale sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz. La condition limite $v_{slip} = v_{eoo}$ est appliquée au niveau des électrodes.

La distribution de la force électrohydrodynamique est semblable à celle de la figure 3.18, ce qui signifie que l'effet électro-osmotique est nul lorsque la fréquence du champ électrique appliqué est de 100kHz. La distribution de la force totale montre que la force diélectrophorétique domine la force de gravité jusqu'à une certaine hauteur.

La figure 3.20 donne les valeurs maximales de la force électro-osmotique calculées à partir des expressions de la vitesse électro-osmotique (équation 3.15) et de la force de trainée (équation 3.23), en fonction de l'écart inter-électrodes, pour un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Ces valeurs sont calculées pour un signal électrique AC appliqué aux électrodes d'une amplitude de 10V, pour deux fréquences (10Hz et 100kHz). Ce graphique montre que la force électro-osmotique diminue lorsque l'écart inter-électrodes augmente. De plus, pour un signal de fréquence égale à 100kHz, la force électro-osmotique est inférieure à 3.10^{-13} N quelques soit l'écart e , ce qui signifie qu'elle est dominée par la force de gravité.

En résumé, pour diminuer les forces électro-osmotiques, il est nécessaire d'employer un signal AC de fréquence supérieure à 100kHz ou d'augmenter l'écart entre les électrodes.

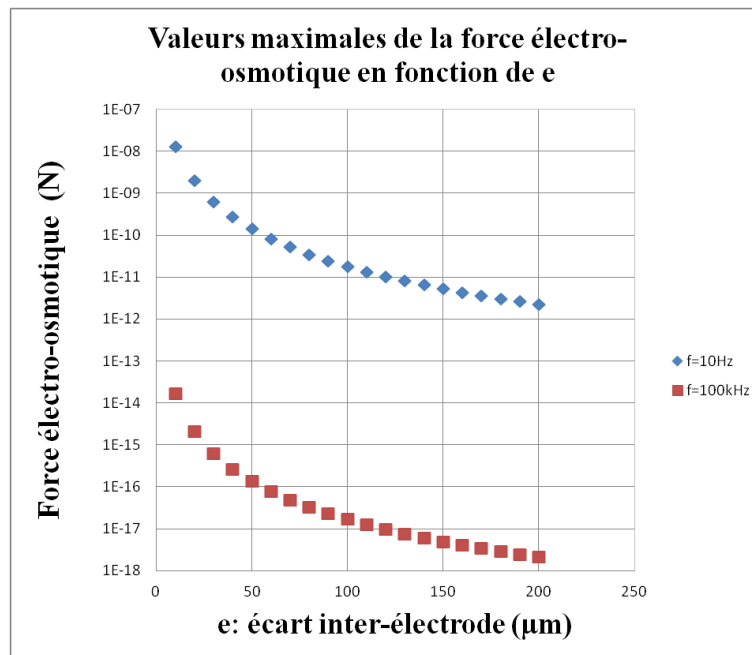


Figure 3.20 : Valeurs maximales de la force électro-osmotique en fonction de l'écart inter-électrodes, pour un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V.

3.4.3.3 Influence de la géométrie (e et w) sur la hauteur de lévitation

Dans le microsystème que nous étudions, il est possible de déterminer une configuration géométrique des microélectrodes qui permette aux colloïdes de léviter, c'est-à-dire d'atteindre une position stable dans l'électrolyte, à une certaine hauteur au dessus des microélectrodes. Pour cela, il faut que les conditions expérimentales créent une distribution spatiale du champ électrique telle que la force diélectrophorétique soit négative (les particules sont repoussées par les électrodes) et qu'elle soit compensée à certaines positions par la force de gravité et la poussée d'Archimède. Des travaux antérieurs ont permis de définir des géométries favorables à cette lévitation [Veas & Schaffer, 1929, Jones & Kallio, 1979, Huang & Pethig, 1991, Fuhr et al., 1992, Cui et al., 2000].

Nous présentons les résultats où la valeur de la conductivité du milieu est fixée à 0.0001 S/m, la différence de potentiel électrique appliquée aux électrodes à 10V et la fréquence du signal électrique AC à 100kHz. Afin d'obtenir uniquement l'effet de la géométrie sur la hauteur de lévitation, nous choisissons une faible conductivité pour limiter les effets d'électroconvection, associée à une fréquence de 100kHz afin que l'électro-osmose soit négligeable. La valeur du potentiel électrique correspond à la gamme de tension que nous employons lors des expérimentations.

La figure 3.21 donne la distribution spatiale des forces diélectrophorétiques, d'électro-osmose et d'électrothermie (réunies sous l'appellation force électrohydrodynamique) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz.

La figure 3.22 donne la distribution spatiale de la force totale (diélectrophorèse, électroosmose, électrothermie, gravité et poussée d'Archimède) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz.

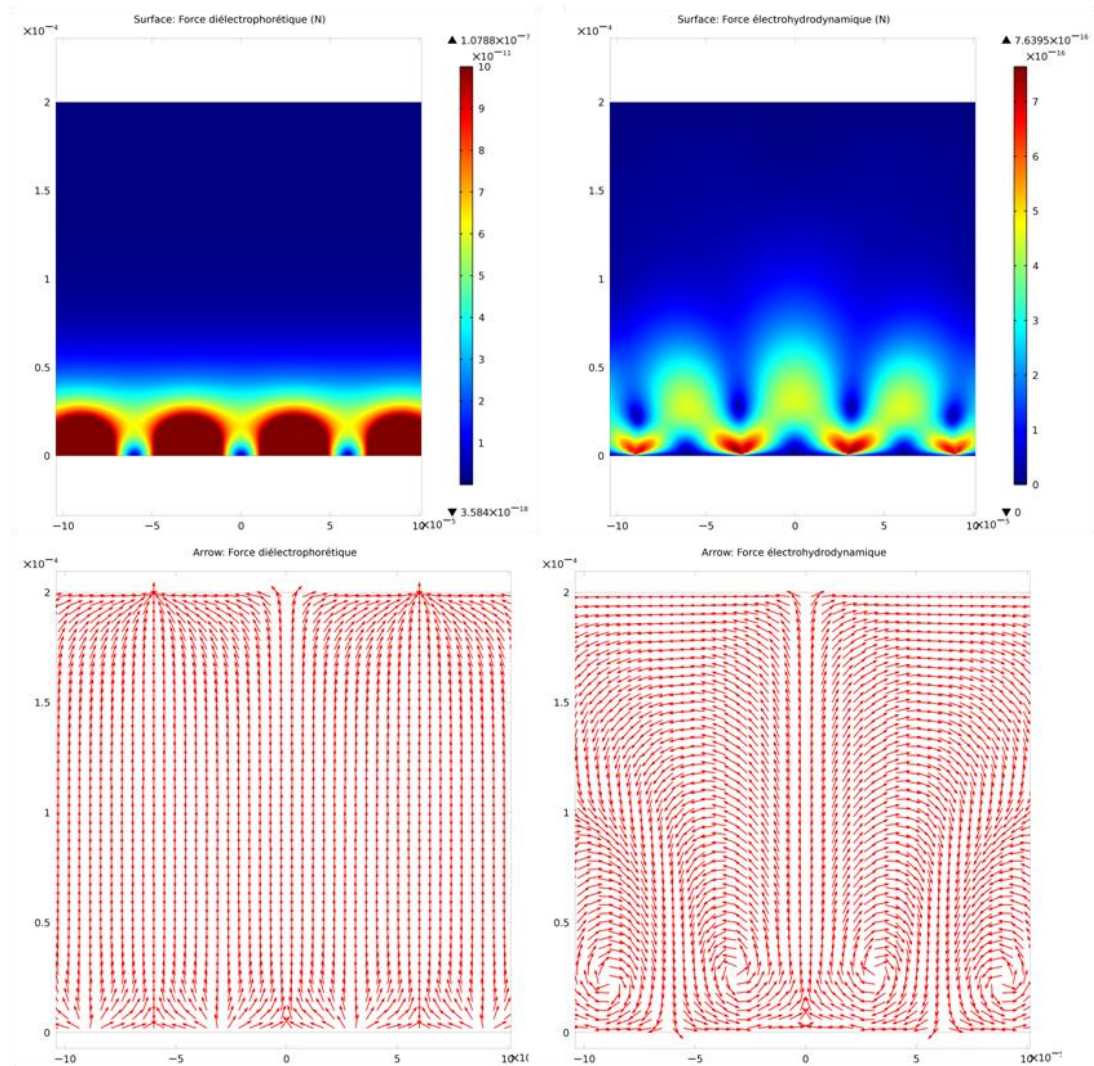


Figure 3.21 : Distribution spatiale des forces diélectrophorétique et électrohydrodynamique (dite de trainée) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz.

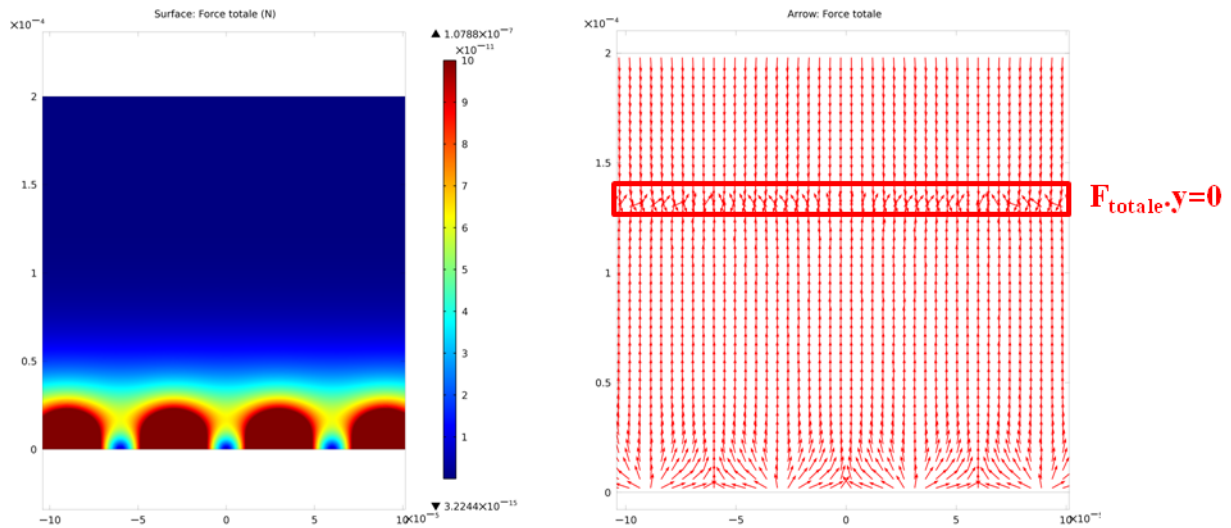


Figure 3.22 : Distribution spatiale de la force totale (diélectrophorèse, électroosmose, électrothermie, gravité et poussée d'Archimède) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,0001 \text{ S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz .

L'analyse de la figure 3.21 montre que la force électrohydrodynamique est très faible (de l'ordre de 10^{-16} N) devant la force diélectrophorétique. Le sens de la force diélectrophorétique indiquée par la carte de vecteurs montre qu'il s'agit de diélectrophorèse négative (le sens se dirige vers le haut, au dessus des électrodes). De plus, nous avons vu précédemment que la force électro-osmotique est négligeable pour des fréquences supérieures à 100kHz . De ce fait, la figure 3.21 permet de vérifier que les conditions d'électro-osmose négligeable et de force électrohydrodynamique faible sont bien remplies grâce au choix des paramètres de fréquence et de conductivité.

Ce fait est confirmé par la carte de la distribution spatiale de la force totale (diélectrophorèse, électroosmose, électrothermie, gravité et poussée d'Archimède) (cf. figure 3.22). La carte des équivalents de la force totale est identique à la carte d'équivalents de la force diélectrophorétique de la figure 3.21. De ce fait, les conditions paramétriques $\{\sigma=0,0001\text{S/m}, V_e=10\text{V}, f=100\text{kHz}\}$ entraînent un régime purement diélectrophorétique. De ce fait, nous pouvons extraire la hauteur de lévitation en relevant la position y où la composante verticale

de la force totale est nulle. Cette zone est illustrée sur la carte de vecteurs de la force totale (cf. figure 3.22). Ainsi, en résolvant l'équation $\overrightarrow{F_{totale}} \cdot \vec{y} = 0$, nous obtenons la valeur de la hauteur de lévitation, notée h .

En suivant la procédure détaillée ci-dessus, nous avons extrait les hauteurs de lévitation pour différentes géométries. Ces résultats sont résumés dans la figure 3.23 qui donne la hauteur de lévitation en fonction de l'espace inter-électrodes pour différentes valeurs de la largeur des électrodes.

L'analyse de cette figure montre que lorsque l'on augmente la largeur des électrodes (w), la hauteur de lévitation augmente. De même, dans une certaine gamme de valeurs, lorsqu'on augmente l'espace inter-électrodes, on augmente la hauteur de lévitation.

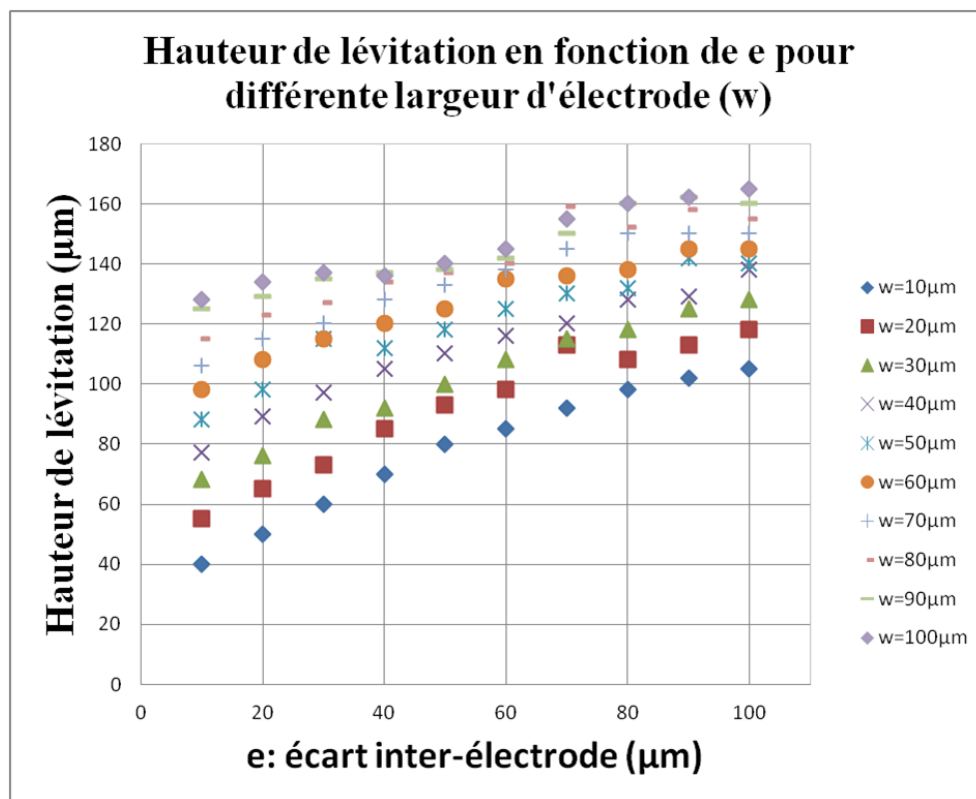


Figure 3.23 : Hauteur de lévitation des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique égale à $0,0001 \text{ S/m}$ et soumises à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 10 Volts appliqué aux microélectrodes en fonction de l'espace inter-électrodes et de la largeur des électrodes, extraite des simulations numériques par éléments finis (COMSOL MULIPHYSICS).

Nous avons également fait cette étude pour une conductivité plus élevée de l'électrolyte. Ainsi, la figure 3.24 présente l'évolution de la hauteur de lévitation de particules de latex suspendues dans de l'eau de conductivité 0,001 S/m. Nous remarquons peu de différences sur la valeur de la hauteur de lévitation entre un électrolyte de conductivité égale à 0,0001 S/m et 0,001 S/m. Cependant, lorsque cet espace inter-électrodes est supérieur à 150 μm , la hauteur de lévitation diminue. Pour interpréter ce résultat, il faut analyser les cartes d'isovaleurs de la force totale pour différentes géométries d'électrodes (cf. figure 3.25).

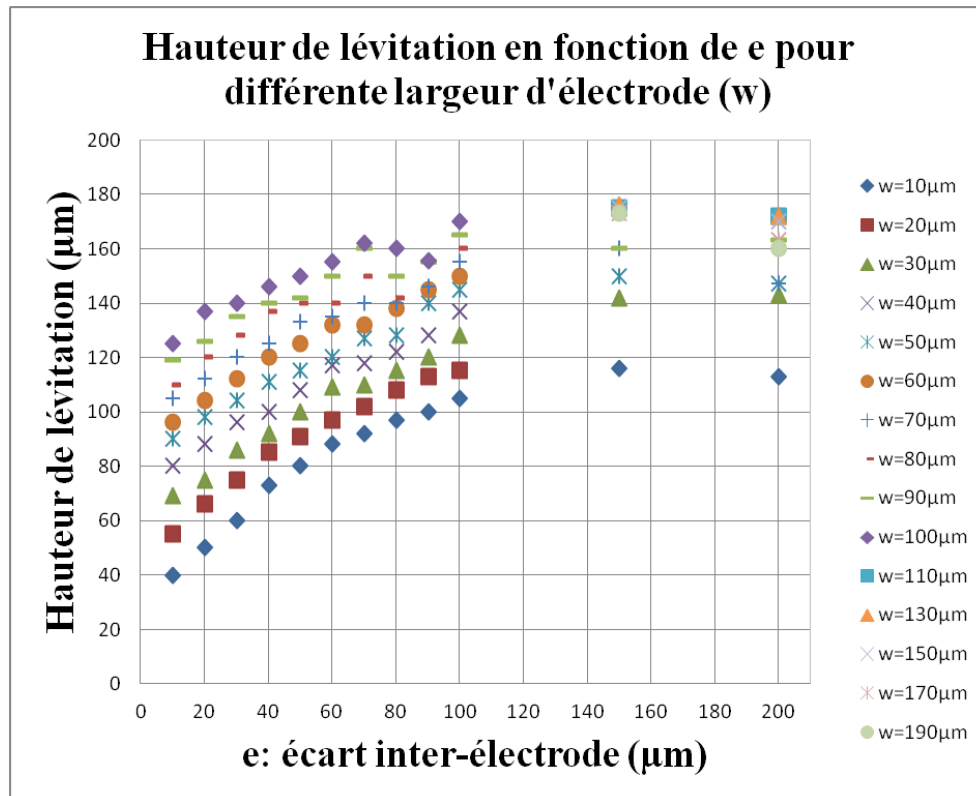


Figure 3.24 : Hauteur de lévitation des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μm suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique égale à 0,001 S/m et soumises à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 10 Volts appliqué aux microélectrodes en fonction de l'espace inter-électrodes et de la largeur des électrodes, extraite des simulations numériques par éléments finis (COMSOL MULIPHYSICS).

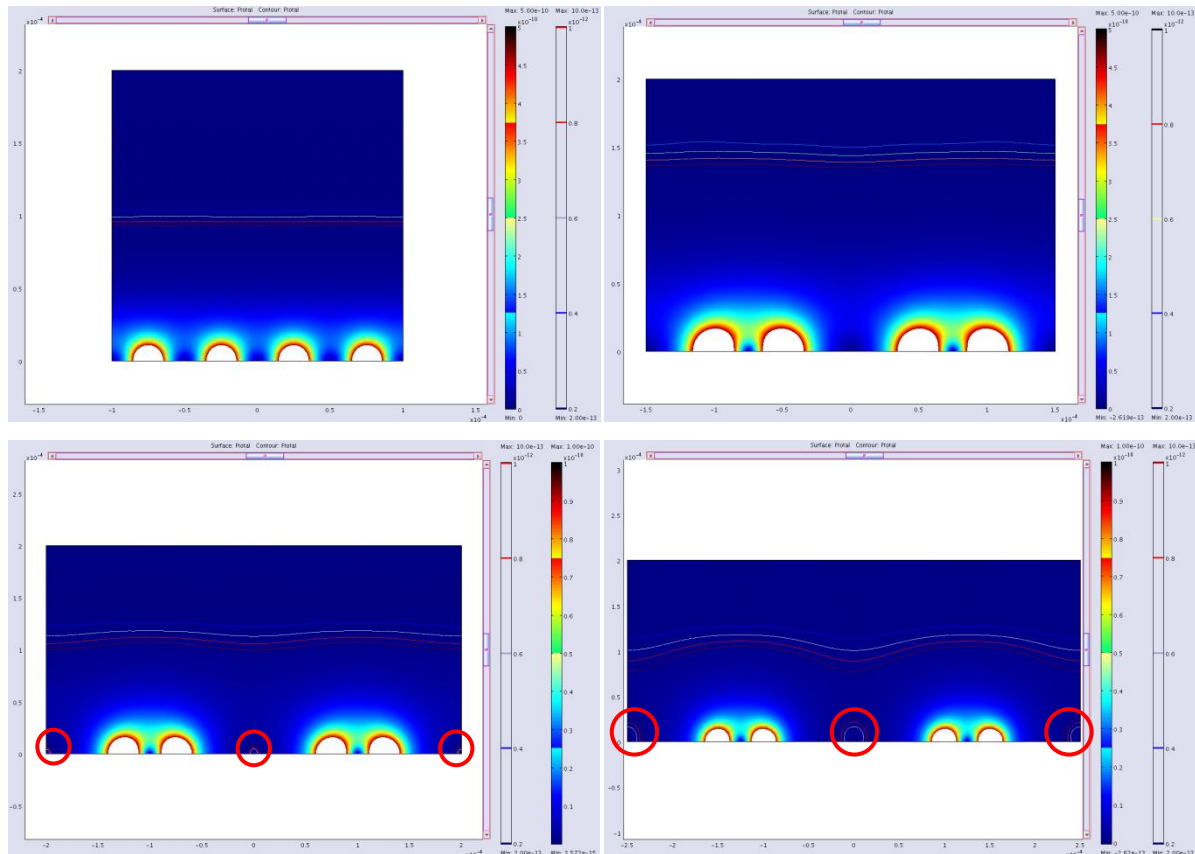


Figure 3.25 : Distribution spatiale de la force totale (diélectrophorèse, électroosmose, électrothermie, gravité et poussée d'Archimède) sous forme de cartes d'équivalents pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,001 S/m et différentes géométries : a) $w=50$ μ m et $e=50$ μ m, b) $w=50$ μ m et $e=100$ μ m, c) $w=50$ μ m et $e=150$ μ m, d) $w=50$ μ m et $e=200$ μ m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz.

La figure 3.25 montre la distribution de la force totale pour quatre configurations d'électrodes. Pour une largeur d'électrode de 50 μ m, lorsque l'écart est supérieur à 100 μ m, il apparaît une zone où la force totale est inférieure à la force de gravité. Cette aire est d'autant plus grande que l'écart e augmente. Pour $w < 100\mu\text{m}$ et $e/w > 4$, la force de gravité entre les électrodes est considérée comme trop importante devant les autres forces. Pour $w > 100\mu\text{m}$, la force de gravité est trop importante pour $e/w > 2$. De ce fait, ces choix seront exclus lors de la fabrication des structures optimisées.

Nous avons également étudié l'influence d'une conductivité élevée. Pour une conductivité du liquide de 0,01 S/m, l'effet électrothermique modifie l'équilibre des forces, ce qui fait que la hauteur de lévitation est diminuée de 10 à 20 μm (cf. figure 3.26).

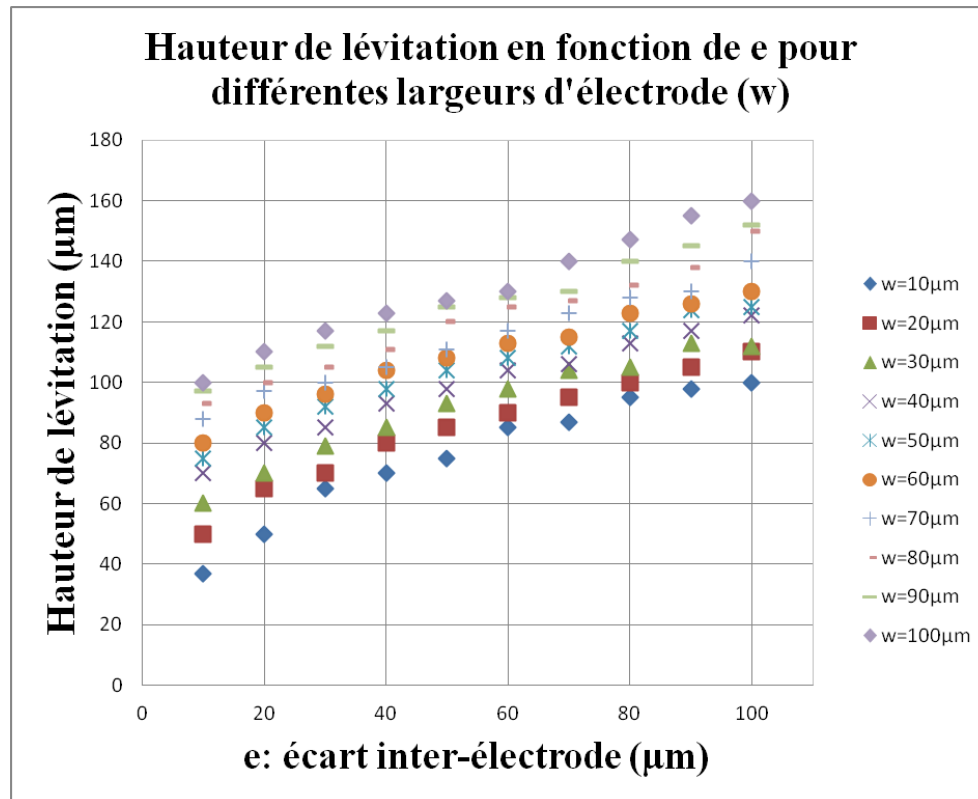


Figure 3.26 : Hauteur de lévitation des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μm suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique égale à 0,01 S/m et soumises à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 10 Volts appliqué aux microélectrodes en fonction de l'espace inter-électrodes et de la largeur des électrodes, extraite des simulations numériques par éléments finis (COMSOL MULIPHYSICS).

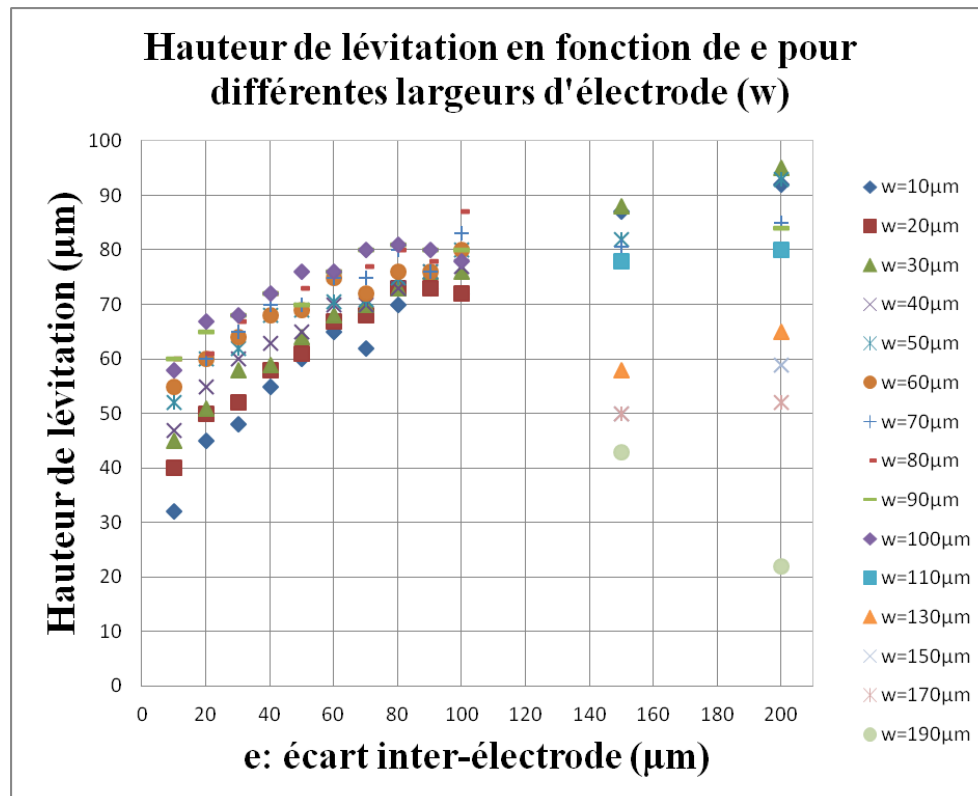


Figure 3.27 : Hauteur de lévitation des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, de conductivité électrique égale à $0,001 \text{ S/m}$ et soumises à un champ électrique de fréquence 100kHz généré par un potentiel électrique de 100 Volts appliqué aux microélectrodes en fonction de l'espace inter-électrodes et de la largeur des électrodes, extraite des simulations numériques par éléments finis (COMSOL MULIPHYSICS).

Pour une conductivité intermédiaire ($0,001\text{S/m}$) et un potentiel électrique de 100 Volts appliqué aux électrodes (Figure 3.27), la hauteur de lévitation diminue d'une valeur de 50 à $80\mu\text{m}$ lorsque la largeur de l'électrode est importante ($w>60\mu\text{m}$). La force d'électroconvection est prédominante du fait de l'application d'une tension élevée. De plus, la position de la hauteur de lévitation est localisée et n'est plus répartie sur la totalité du plan parallèle au plan des électrodes (Figure 3.28).

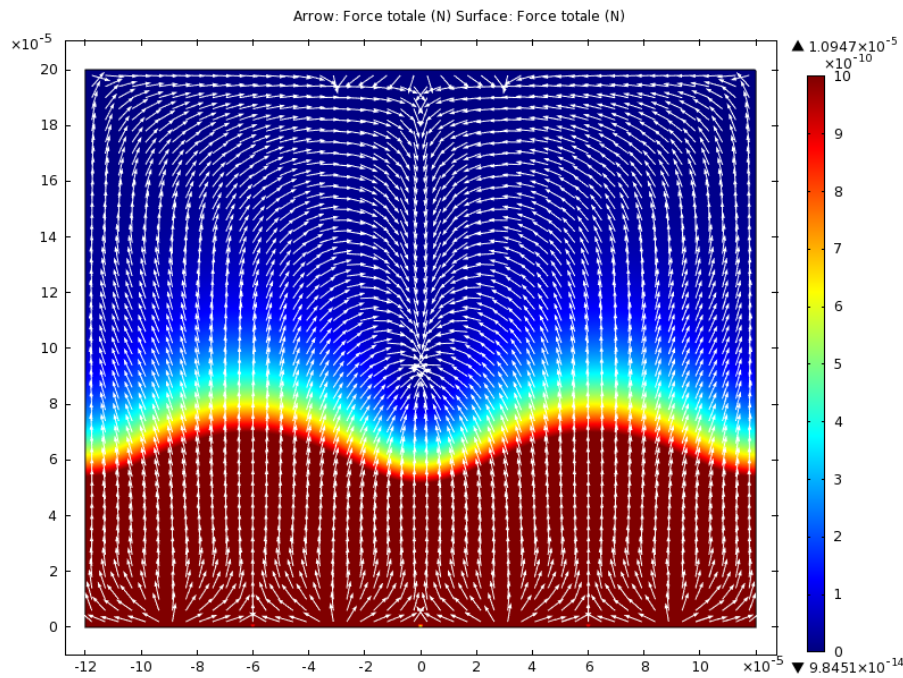


Figure 3.28 : Distribution spatiale des forces diélectrophorétique et électrohydrodynamique (dite de trainée) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m⁻¹ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μ m suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,0001 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz.

3.4.3.4 Conclusion sur le modèle 2D

L'exploitation des résultats du modèle 2D apporte un éclairage sur le choix des paramètres qui favorisent la concentration de particules en suspension dans un réservoir de taille millimétrique. Les paramètres étudiés sont la tension du signal appliqué V, sa fréquence f, la conductivité électrique du liquide σ , et les paramètres géométriques e (espace inter-électrodes) et w (largeur de l'électrode).

L'étude de l'évolution de la température en fonction de la conductivité électrique du milieu, de la tension du signal appliquée et de la géométrie des microélectrodes montre que pour une conductivité électrique de 0,01S/m, l'emploi de tensions électriques supérieures à 50 Volts

n'est pas acceptable. De plus, pour une conductivité électrique supérieure à 0,001S/m, il est nécessaire de prendre en compte l'influence de la géométrie des électrodes sur l'élévation de température dans le liquide. Pour une tension électrique de 100 Volts et une conductivité électrique de 0,001S/m, la température du liquide est supérieure à 40°C lorsque le rapport e/w est inférieur à 5. De manière générale, la température du liquide diminue lorsque le rapport e/w augmente.

L'effet électro-osmotique est dominant à basses fréquences. Par contre, il est négligeable devant les autres forces aux fréquences supérieures à 100kHz pour un liquide de conductivité électrique égale à 0,0001S/m. L'amplitude de la force électro-osmotique diminue avec l'espace inter-électrodes.

En ne prenant en compte que la force diélectrophorétique et la force de gravité, nous obtenons la valeur de la position d'équilibre d'une particule en suspension dans le liquide. Cette position est la hauteur de lévitation. Sa valeur maximale est de 180 μ m pour un espace inter-électrodes de 150 μ m. Pour des espacements plus grands, la hauteur de lévitation diminue. Pour une largeur d'électrode fixée, la hauteur de lévitation est maximale pour des valeurs de e proches de 150 μ m. Cependant, pour ces valeurs de e , il existe des zones entre les électrodes où la force de gravité domine la force de diélectrophorèse. Les particules piégées dans ces zones ne peuvent donc pas léviter. De plus, lorsque l'effet électrothermique est non négligeable (conductivité électrique du liquide supérieure à 0,001S/m), la hauteur de lévitation est diminuée de plusieurs dizaines de microns. De ce fait, le choix de e et de w se limite à des valeurs inférieures à 150 μ m. Enfin, Pour $w < 100\mu$ m, le rapport e/w doit être inférieur à 4 et pour $w > 100\mu$ m, le rapport e/w doit être inférieur à 2. Ces dernières conditions permettent de limiter le nombre de particules qui peuvent être piégées entre les électrodes.

3.4.4 Résultats des simulations 3D

La simulation 3D permet de visualiser les déplacements du liquide à différentes hauteurs, sur toute la longueur du réseau de microélectrodes. Elle apporte des données sur la distribution des forces qui s'exercent sur le liquide dans le réservoir. Les simulations ont été effectuées pour $\{\sigma > 0,0001\text{S/m}, V_e=10, f > 100\text{kHz}, e \text{ et } w < 150\mu\text{m}\}$. Dans les conditions choisies, l'effet électro-osmotique est négligeable dans tous les cas.

Le cas idéal pour la concentration correspond à une conductivité électrique du milieu égale à 0.01S/m , une tension de 10 Volts et une fréquence de 100kHz . En effet, l'échauffement est faible (quelques degrés), la hauteur de lévitation n'est pas trop modifiée par l'effet électrothermique et les courants de liquide générés par la force d'électroconvection ont une force équivalente à la force diélectrophorétique.

Les résultats de simulation dans le cas idéal sont présentés ci-dessus. La zone située entre le plan des électrodes et le plan parallèle au niveau de la hauteur de lévitation est dominée par la force diélectrophorétique (Figure 3.29). Hors de cette zone, la force d'électroconvection domine. Les valeurs moyennes de F_{dep} dans les plans (yz) et (zx) sont respectivement de $1,2 \cdot 10^{-11}\text{N}$ et $1,1 \cdot 10^{-11}\text{N}$. Les valeurs moyennes de F_{ehd} dans les plans (yz) et (zx) sont respectivement de $2,2 \cdot 10^{-12}\text{N}$ et $3,8 \cdot 10^{-12}\text{N}$.

La figure 3.30 montre la distribution spatiale de la force électrohydrodynamique sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans les plans (xz) et (yz). Cette représentation permet de se figurer les cellules de convection créées par l'effet électrothermique. Les vortex où sont rassemblées les particules sont entourés en noir.

La figure 3.31 représente la distribution spatiale de la force électrohydrodynamique (a-c) et de la force totale (d-f) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans le plan (xy) à différentes hauteurs z . Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange ($L_{elec}=2\text{mm}, w=80\mu\text{m}$ et $e=80\mu\text{m}$). A une hauteur inférieure à la hauteur de lévitation ($z=40\mu\text{m}$), la distribution de la force électrohydrodynamique est très différente de la distribution de la force totale (Figure 3.31.a-d). Le régime de diélectrophorèse domine. Au

niveau de la hauteur de lévitation ($z=80\mu\text{m}$), la distribution de la force totale est semblable à celle de la force électrohydrodynamique, et des vortex sont clairement visibles (Figure 3.31.b-e). Les valeurs moyennes de F_{dep} et F_{ehd} dans le plan (xy) au niveau de la hauteur de lévitation sont respectivement de $3,6 \cdot 10^{-12}\text{N}$ et $4 \cdot 10^{-12}\text{N}$, ce qui confirme que la force électrohydrodynamique domine la force diélectrophorétique à cette hauteur. Les zones où la distribution des forces forme des vortex sont les espaces où les particules se rassemblent. Au dessus du niveau de la hauteur de lévitation, le régime d'électroconvection domine totalement (Figure 3.31.c-f).

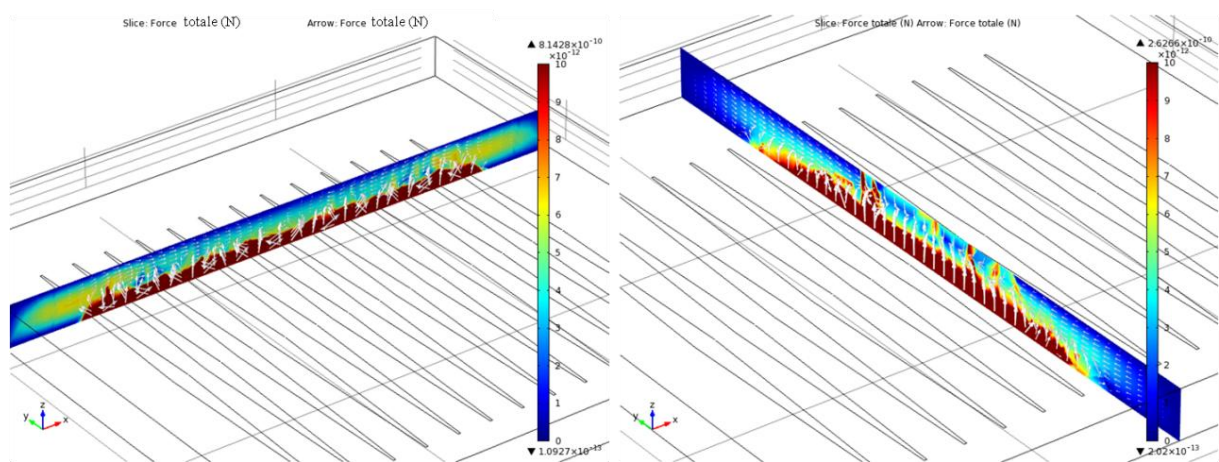


Figure 3.29 : Distribution spatiale de la force totale sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans les plans (xz) et (yz) pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1 \cdot 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01 \text{ S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange ($L_{elec}=2\text{mm}$, $w=80\mu\text{m}$ et $e=80\mu\text{m}$).

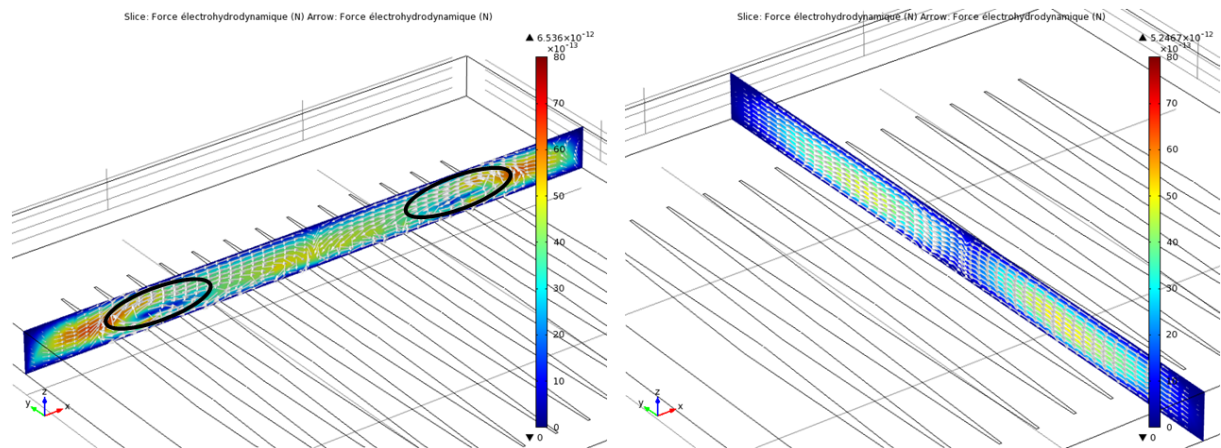


Figure 3.30 : Distribution spatiale de la force électrohydrodynamique sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans les plans (xz) et (yz) pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01 \text{ S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange ($L_{elec}=2\text{mm}$, $w=80\mu\text{m}$ et $e=80\mu\text{m}$).

En résumé, la concentration des particules en suspension dans un électrolyte est régit par les courants électrothermiques au niveau de la hauteur de lévitation. Les particules situées en dessous de cette zone subissent une force ascendante (diélectrophorèse négative) qui les repousse au dessus de ce niveau. Au-delà de ce niveau, la force électrohydrodynamique domine et les particules sont emportées et piégées au sein de vortex convectifs.

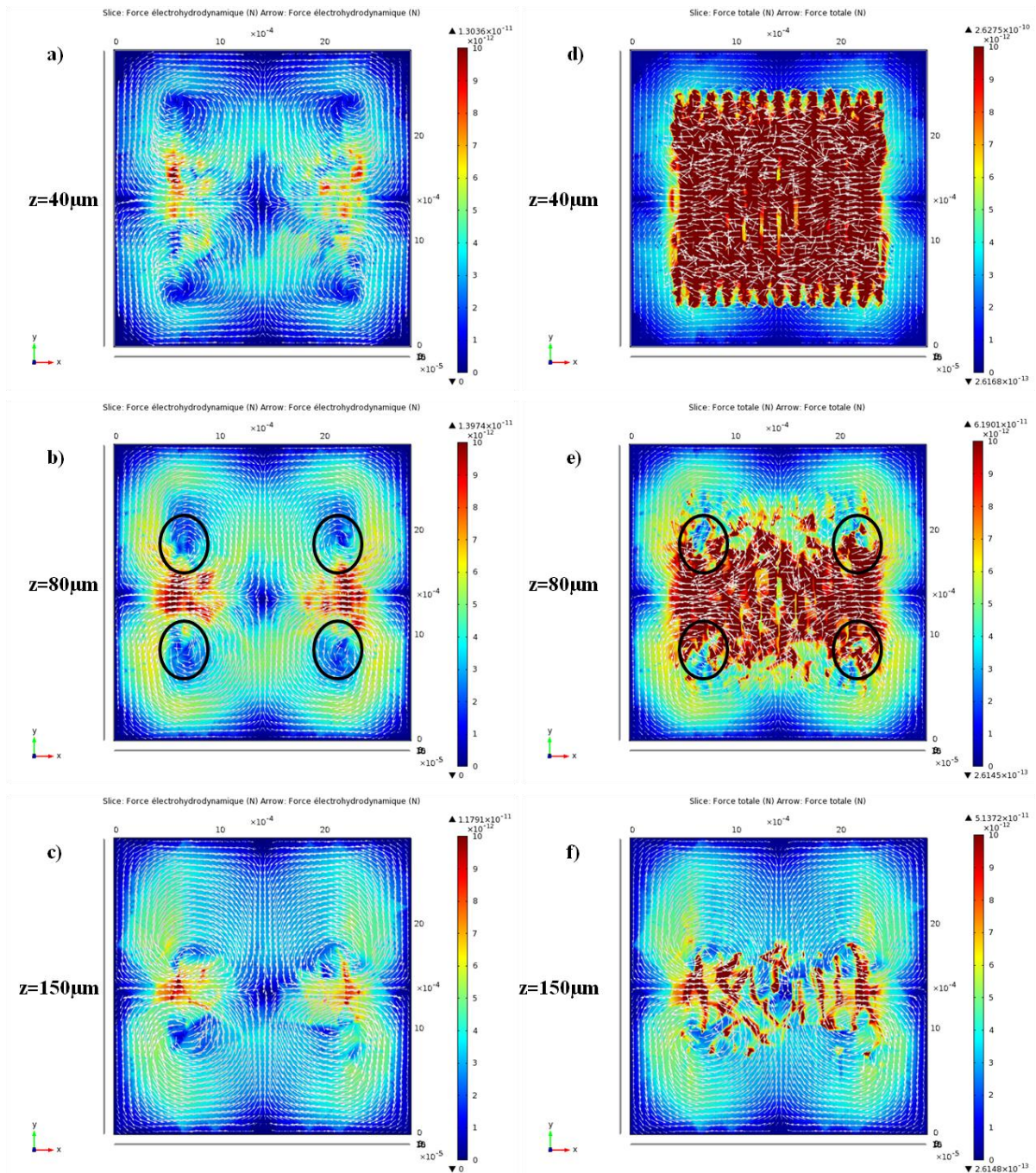


Figure 3.31 : Distribution spatiale de la force électrohydrodynamique (a-c) et de la force totale (d-f) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans le plan (xy) à différentes hauteurs z , pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}$ S.m $^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à 5 μm suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0,01 S/m. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz. Le système de microélectrodes est en forme de losange ($L_{elec}=2\text{mm}$, $w=80\mu\text{m}$ et $e=80\mu\text{m}$).

3.4.4.1 Influence de la conductivité électrique du liquide

Les résultats précédents montrent que le processus de rassemblement des particules s'effectue au niveau de la hauteur de lévitation. De ce fait, afin d'analyser l'influence de la conductivité, nous présentons la distribution de la force totale dans le plan au niveau de cette hauteur, ainsi que la comparaison entre la force diélectrophorétique et la force électrohydrodynamique le long d'une ligne imaginaire de direction Oy, passant par le centre du système à cette hauteur.

La figure 3.32 représente la distribution spatiale de la force totale (a-c) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans le plan (xy), associée à la représentation graphique des forces diélectrophorétiques et électrohydrodynamiques (d-f) au niveau de la hauteur de lévitation pour une géométrie d'électrodes en forme d'éventail ($L_{elec}=4\text{mm}$, $w=20\mu\text{m}$ et $e=10\mu\text{m}$) et un signal électrique appliqué de 10 Volts à 100kHz.

Pour une conductivité électrique du liquide de 0,0001S/m, la force diélectrophorétique domine complètement la force électrohydrodynamique, ce qui rend le rassemblement des particules impossible à cette tension (Figure 3.32.a-d).

Pour une conductivité électrique du liquide de 0,001S/m, la force diélectrophorétique ne domine pas la force électrohydrodynamique sur l'ensemble du réseau d'électrodes. En effet, la distribution de la force totale est en forme de vortex au niveau de la base de la forme en éventail (Figure 3.32.b-e).

Pour une conductivité électrique du liquide de 0,01S/m, la force électrohydrodynamique domine complètement la force diélectrophorétique, ce qui fait que les particules peuvent être rassemblées à la tension de 10 Volts (Figure 3.32.c-f).

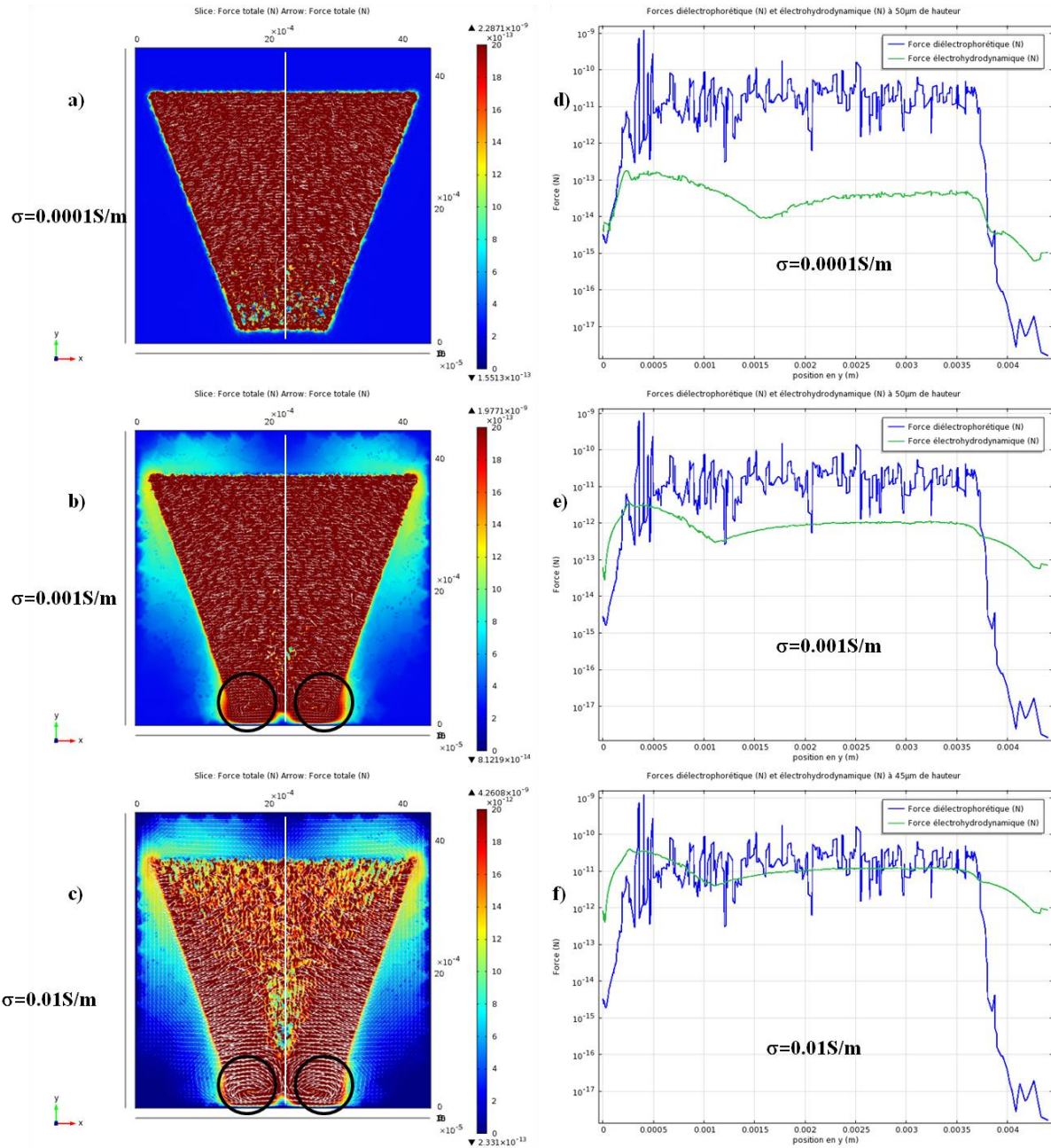


Figure 3.32 : Distribution spatiale de la force totale (a-c) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans le plan (xy), et représentation graphique de la force diélectrophorétique et électrohydrodynamique (d-f) au niveau de la hauteur de lévitation, pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,0001 \text{ S/m}$ (a-d), $0,001 \text{ S/m}$ (b-e) et $0,01 \text{ S/m}$ (c-f). Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme d'éventail ($L_{elec}=4 \text{mm}$, $w=20 \mu\text{m}$ et $e=10 \mu\text{m}$).

3.4.4.2 Influence de la géométrie (e)

L'influence de la géométrie est étudiée sur un réseau d'électrodes en forme de losange pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$, suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01\text{S/m}$. Le critère géométrique le plus influent sur le résultat de concentration est l'espace inter-électrodes (e). Nous l'avons évoqué dans la conclusion du chapitre 2. De ce fait, nous présentons l'influence de e sur un réseau d'électrodes en forme de losange où la largeur de w est fixée, pour deux valeurs de e distinctes.

La figure 3.33 montre les représentations graphiques des forces diélectrophorétiques et électrohydrodynamiques au niveau de la hauteur de lévitation, pour un signal électrique AC de 10 Volts et une fréquence de 100kHz. Le système de microélectrodes est en forme de losange où $L_{elec}= 2\text{mm}$, $w=100\mu\text{m}$ et $e=50\mu\text{m}$ (figure 3.33.a-c) et $L_{elec}= 2\text{mm}$, $w=100\mu\text{m}$ et $e=150\mu\text{m}$ (figure 3.33.d-f).

De manière générale, la force électrohydrodynamique ne varie pas avec la hauteur dans les deux cas ($e=50\mu\text{m}$ et $e=150\mu\text{m}$). Pour $e=50\mu\text{m}$, elle est de l'ordre de 10^{-12}N (figure 3.33.a-c). Pour $e=150\mu\text{m}$, elle diminue d'une demi-décade (figure 3.33.d-f). Par conséquent, la force électrohydrodynamique dépend plus de l'espace inter-électrodes que de la hauteur.

La force diélectrophorétique diminue lorsque la hauteur augmente (figure 3.33). Elle diminue également lorsque l'espace inter électrode augmente (figure 3.33.d-f). Par conséquent, la force diélectrophorétique dépend de l'espace inter-électrodes et de la hauteur.

De ce fait, pour entrer dans le cas idéal où la force électrohydrodynamique domine la force diélectrophorétique à la hauteur de lévitation, il est nécessaire de choisir une valeur d'espace inter-électrodes optimale. Ce choix n'est pas trivial, car il ne suffit pas de focaliser le choix sur de petites valeurs de e (c'est-à-dire inférieures à $100\mu\text{m}$). En effet, si e est trop petit ($10\mu\text{m}$), il est possible que la force diélectrophorétique domine la force électrohydrodynamique au niveau de la hauteur de lévitation.

Nous allons discuter ce point dans la conclusion de ce chapitre.

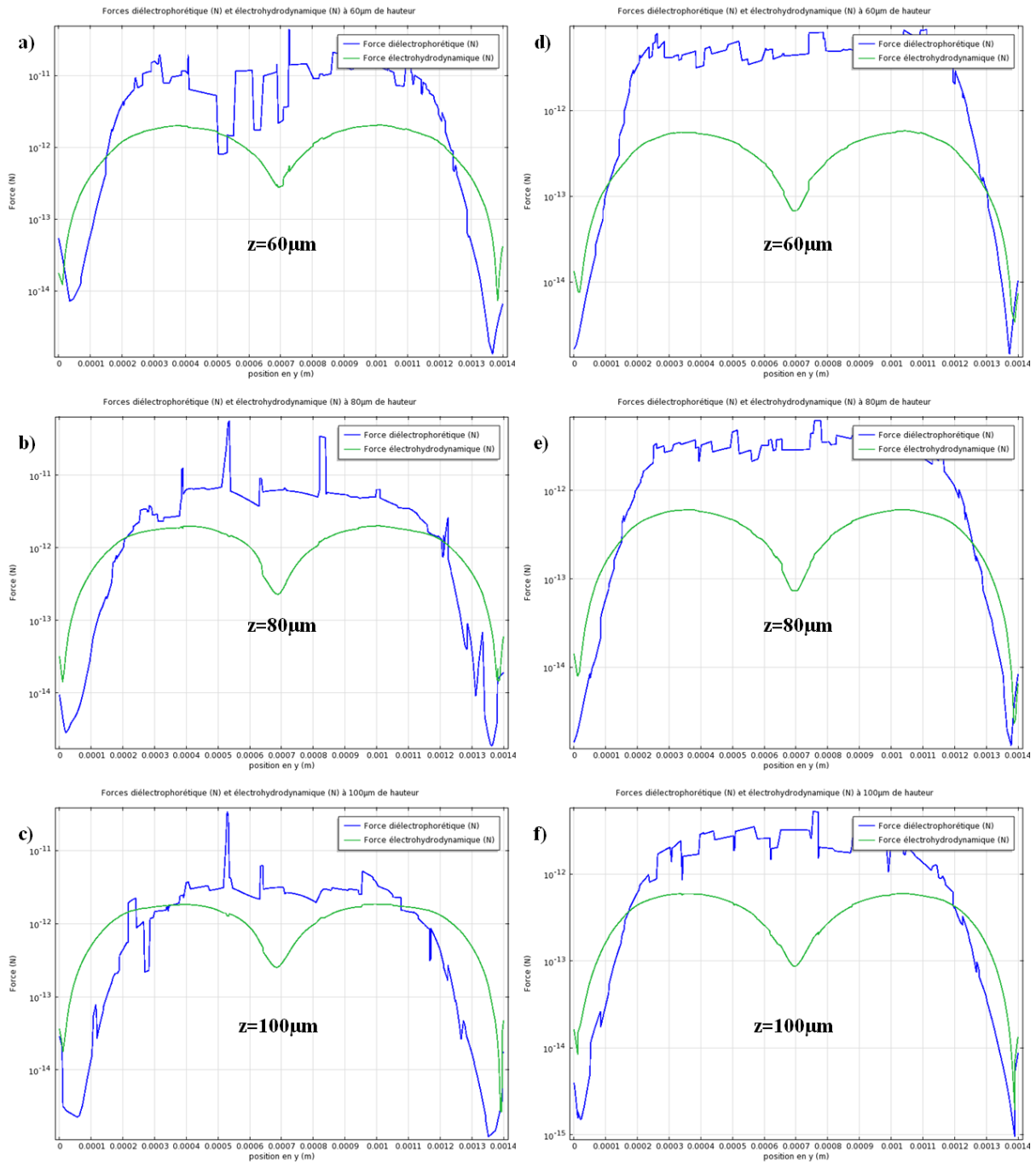


Figure 3.33 : Représentations graphiques de la force diélectrophorétique et électrohydrodynamique à différentes hauteurs, pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4}\text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5\mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01\text{S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange : a-c) $L_{\text{elec}}=2\text{mm}$, $w=100\mu\text{m}$ et d-f) $L_{\text{elec}}=2\text{mm}$, $w=100\mu\text{m}$ et $e=150\mu\text{m}$.

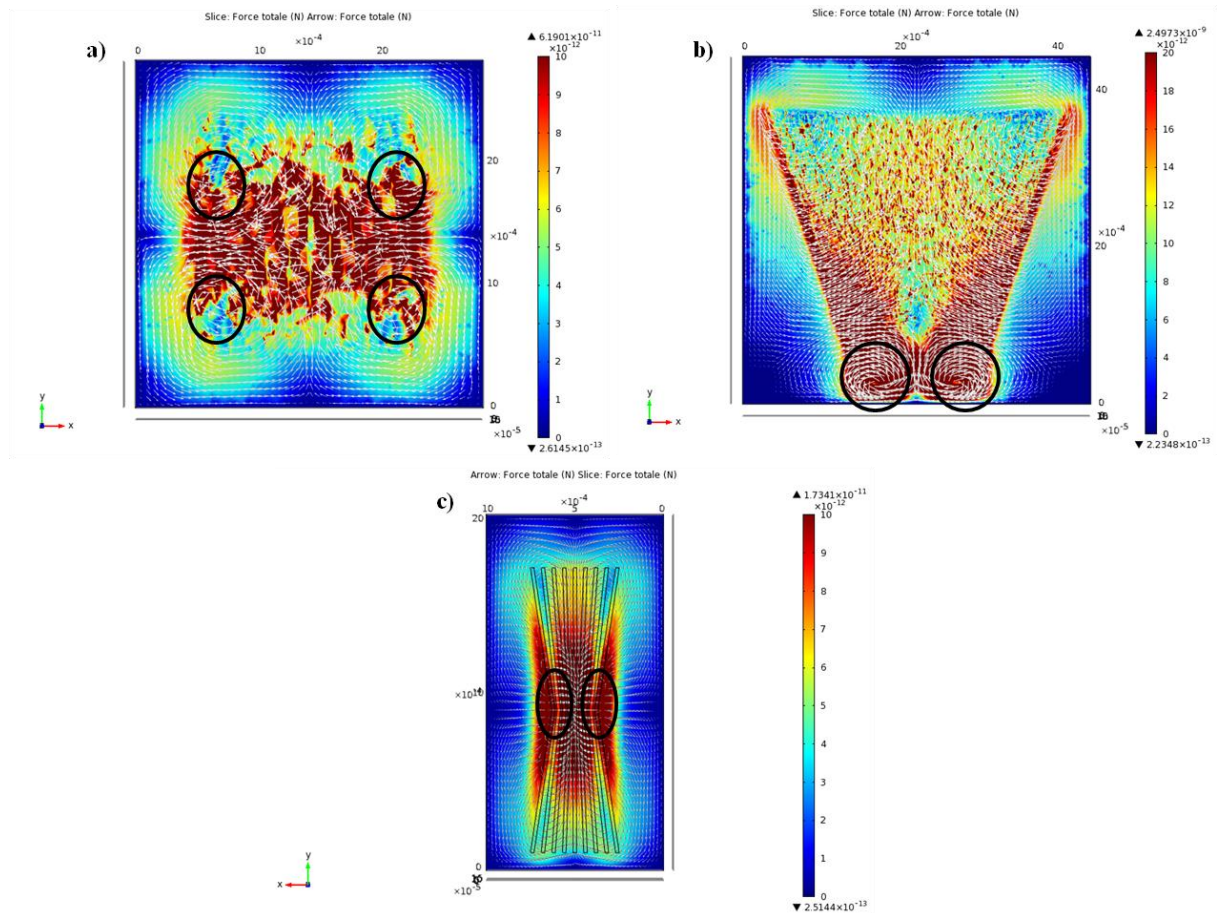


Figure 3.34 : Distribution spatiale de la force totale (a-c) sous forme de cartes d'équivalents et de vecteurs dans le plan (xy), au niveau de la hauteur de lévitation, pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\varepsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01\text{S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de : a) losange ($L_{elec}=2\text{mm}$, $w=80\mu\text{m}$ et $e=80\mu\text{m}$), b) d'éventail ($L_{elec}=4\text{mm}$, $w=20\mu\text{m}$ et $e=10\mu\text{m}$) et c) d'éventail symétrique ($L_{elec}=2\text{mm}$, $w=20\mu\text{m}$ et $e=10\mu\text{m}$). Les zones de concentration au niveau des vortex sont entourées en noir.

Enfin, la figure 3.34 montre la distribution de la force totale au niveau de la hauteur de lévitation et les zones de concentration des particules pour les trois types de réseau d'électrodes étudiés. Chaque zone de concentration se trouve en périphérie du réseau, ce qui est une condition favorable à l'étape d'extraction par la technologie d'électromouillage.

3.5 Conclusion

Nous avons conçu un modèle que nous avons implanté dans COMSOL MULTIPHYSICS.

La simulation numérique 2D nous permet de choisir une gamme de valeurs pour les paramètres importants impliqués dans le phénomène de concentration de microparticules en suspension dans un électrolyte. Ces paramètres sont :

- la tension du signal appliqué : V
- la fréquence du signal appliqué : f
- la conductivité électrique du milieu : σ
- les paramètres géométriques des électrodes (e et w).

L'étude de l'influence de ces paramètres sur la température, l'effet électro-osmotique et la hauteur de lévitation des particules permet de définir la gamme de valeurs suivante :

- V est compris entre quelques Volts et 100 Volts selon la conductivité électrique du liquide
- la fréquence de travail est toujours supérieure à 100kHz pour limiter l'électro-osmose
- la conductivité électrique du milieu peut être de l'ordre de 0,01S/m mais ne peut être associée à une tension supérieure à 50 Volts
- e et w sont inférieurs à 150 μ m. Pour $w < 100\mu$ m, le rapport e/w doit être inférieur à 4. Pour $w > 100\mu$ m, le rapport e/w doit être inférieur à 2.

La simulation numérique 3D apporte des informations sur la contribution des différentes forces sur la totalité du réseau d'électrodes. La visualisation de la distribution spatiale des forces sur les différents plans de coupe permet d'identifier la contribution des forces diélectrophorétiques et électrohydrodynamiques. En dessous de la hauteur de lévitation, la force diélectrophorétique domine.

Dans le cas idéal de concentration, la force électrohydrodynamique est supérieure à la force diélectrophorétique au niveau de la hauteur de lévitation. La distribution de la force totale en forme de vortex crée des zones où les particules sont concentrées et piégées. Ce type de distribution est visible pour les trois types de réseau d'électrodes étudiés.

L'influence de l'espace inter-électrodes sur l'équilibre des forces est prépondérante, comme le montre les deux exemples suivants.

Dans le cas de la figure 3.35, la largeur maximale d'une électrode est de $30\mu\text{m}$, et l'écart minimal entre les électrodes est de $10\mu\text{m}$. Il s'agit d'une configuration où les électrodes sont très proches les unes des autres. Le fait que F_{ehd} soit faible dans le bilan total indique que la contribution de F_{dep} est prépondérante. La figure 3.36 corrobore cette affirmation. Les particules s'alignent au dessus des électrodes par diélectrophorèse négative.

Dans le cas de la figure 3.37, la largeur maximale d'une électrode est la même que précédemment ($30\mu\text{m}$), seul l'écart minimal entre les électrodes change (il est de $30\mu\text{m}$). Il s'agit d'une configuration où les électrodes sont plus éloignées entre elles. Dans ce cas de figure, le simple fait d'augmenter l'écart entre les électrodes modifie l'équilibre des forces. La contribution de F_{ehd} est plus importante que F_{dep} . Les mouvements de liquides de grande ampleur transportent les particules sur de grandes distances (centaines de microns, millimètres). La force diélectrophorétique est trop minime face à la force électrohydrodynamique au niveau et au-delà de la hauteur de lévitation. Les courants fluidiques emportent et rassemblent les particules en suspensions sur les bords du réservoir (figure 3.38).

En résumé, l'estimation de la contribution de F_{ehd} dans le bilan de la force totale rend compte du potentiel concentrateur du système. La comparaison des résultats de simulation 3D avec l'expérience montre clairement le rôle prépondérant de l'espace inter-électrodes dans les mouvements de fluide générés par l'effet ACET.

Nous allons valider ces résultats de simulations par des expérimentations dans le cas défavorable ($\sigma=0,0001\text{S/m}$) pour identifier l'influence du réseau d'électrodes sur les divers phénomènes (dont l'électro-osmose). L'objectif est d'agrandir la taille du réseau en vue de l'étape d'extraction qui repose sur la technique d'électromouillage. Il s'agit de créer une goutte fille, plus petite que le réservoir d'origine. Cette étape est d'autant plus favorable que la surface de la goutte mère est importante. Après agrandissement de la surface du réseau d'électrodes, nous procéderons aux expériences de concentration et d'extraction. Ces résultats expérimentaux sont présentés dans le chapitre 4.

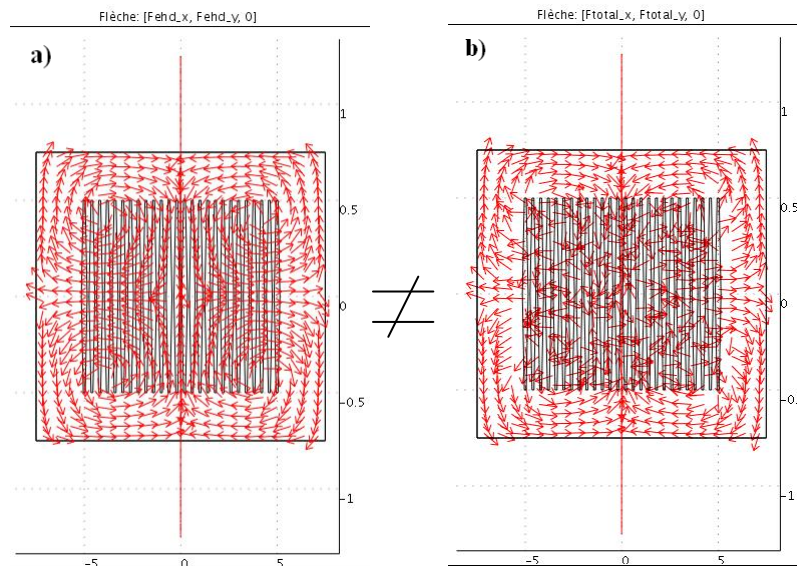


Figure 3.35 : Comparaison de la distribution spatiale de la force électrohydrodynamique (a) et de la force totale (b) sous forme de vecteurs dans le plan (xy) au niveau de la hauteur de lévitation, pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01\text{S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange : $L_{elec}=2\text{mm}$, $w=30\mu\text{m}$ et $e=10\mu\text{m}$.

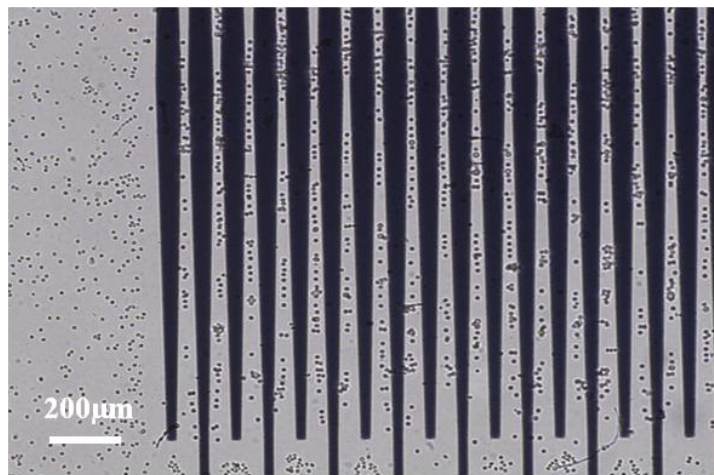


Figure 3.36 : Photographie d'un résultat expérimental dans le cas où il n'y a pas de concentration, pour des particules (parasites) suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01\text{S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange : $L_{elec}=2\text{mm}$, $w=30\mu\text{m}$ et $e=10\mu\text{m}$.

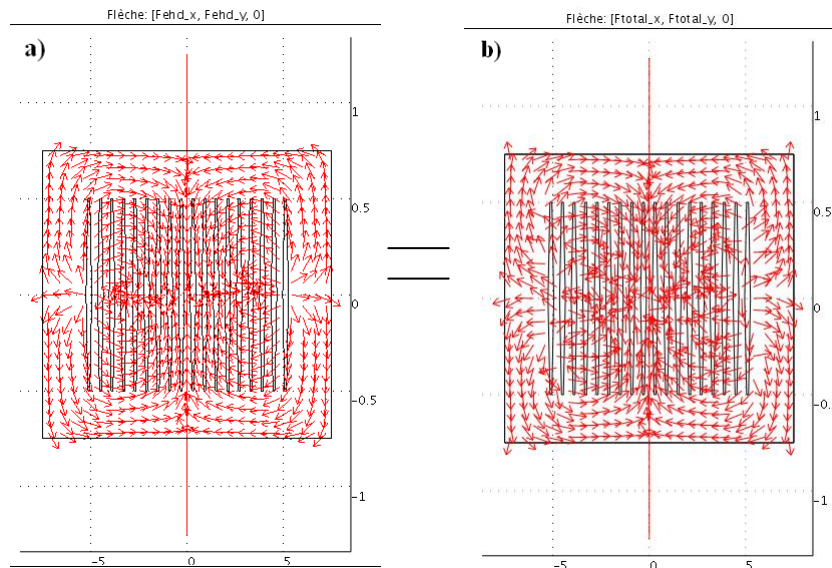


Figure 3.37 : Comparaison de la distribution spatiale de la force électrohydrodynamique (a) et de la force totale (b) sous forme de vecteurs dans le plan (xy) au niveau de la hauteur de lévitation, pour des particules colloïdales de latex ($\sigma_{total}=1.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_p=2,5$) de diamètre égal à $5 \mu\text{m}$ suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de $0,01\text{S/m}$. Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange : $L_{elec}=2\text{mm}$, $w=30\mu\text{m}$ et $e=30\mu\text{m}$.

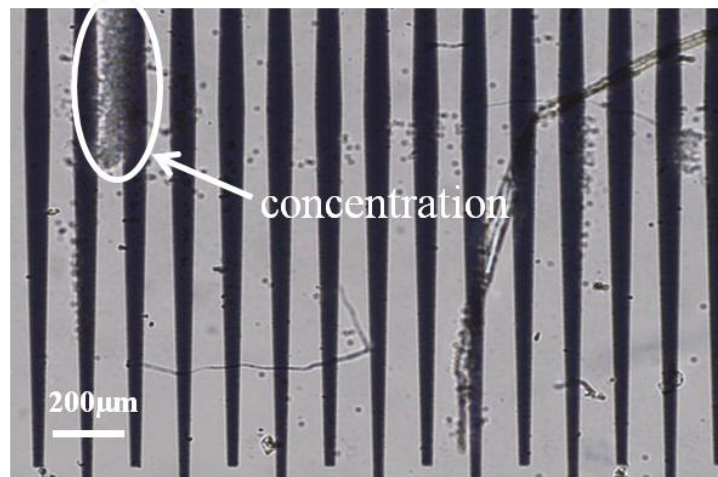


Figure 3.38 : Photographie d'un résultat expérimental dans le cas où il y a concentration, pour des particules (parasites) suspendues dans un électrolyte de KCl dissout dans de l'eau, ayant une conductivité de 0.01S/m . Le signal électrique AC appliqué aux électrodes a une amplitude de 10V et sa fréquence est fixée à 100kHz . Le système de microélectrodes est en forme de losange : $L_{elec}=2\text{mm}$, $w=30\mu\text{m}$ et $e=30\mu\text{m}$.

Bibliographie du Chapitre 3

- [Atten, 1969] Atten, P. (1969). *Les forces en Electrohydrodynamique*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble 1.
- [Castellanos, 1998] Castellanos, A. (1998). *Electrohydrodynamics*. Springer, Wien, New-York.
- [Castellanos et al., 2003] Castellanos, A., Ramos, A., Gonzalez, A., Green, N. G., & Morgan, H. (2003). Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, 2584–2597.
- [Chapman, 1913] Chapman, D. (1913). A contribution to the theory of electrocapillarity. *Phil Mag.*, 25, 475–481.
- [Cui et al., 2009] Cui, H.-H., Voldman, J., He, X.-F., & Lim, K.-M. (2009). Separation of particles by pulsed dielectrophoresis. *Lab Chip*, 9(16), 2306–2312.
- [Cui et al., 2000] Cui, L., Holmes, D., & Morgan, H. (2000). The dielectrophoretic levitation and separation of particles in travelling wave electric fields. *Electrophoresis*, 22, 3893–3901.
- [Fiedler et al., 1998] Fiedler, S., Shirley, S. G., Schnelle, T., & Fuhr, G. (1998). Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Analytical Chemistry*, 70(9), 1909–1915.
- [Fuhr et al., 1992] Fuhr, G., Arnold, W. M., Hagedorn, R., Müller, T., Benecke, W., Wagner, B., & Zimmermann, U. (1992). Levitation, holding, and rotation of cells within traps made by high-frequency fields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1108(2), 215–223.
- [Gonzalez et al., 2000] Gonzalez, A., Ramos, A., Green, N. G., Castellanos, A., & Morgan, H. (2000). Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. ii.a linear double-layer analysis. *Phys. Rev. E*, 61, 4019–4028.

- [Gouy, 1910] Gouy, G. (1910). Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *J. Physiol (London)*, 9, 457–468.
- [Green & Morgan, 1999] Green, N. G. & Morgan, H. (1999). Dielectrophoresis of submicrometer latex spheres. 1. experimental results. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(1), 41–50.
- [Green et al., 2000a] Green, N. G., Ramos, A., Gonzalez, A., Castellanos, A., & Morgan, H. (2000a). Electric field induced fluid flow on microelectrodes: the effect of illumination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 33(2), L13–L17.
- [Green et al., 2001] Green, N. G., Ramos, A., González, A., Castellanos, A., & Morgan, H. (2001). Electrothermally induced fluid flow on microelectrodes. *Journal of Electrostatics*, 53(2), 71–87.
- [Green et al., 2000b] Green, N. G., Ramos, A., González, A., Morgan, H., & Castellanos, A. (2000b). Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. i. experimental measurements. *Phys. Rev. E*, 61(4), 4011–4018.
- [Green et al., 2002] Green, N. G., Ramos, A., González, A., Morgan, H., & Castellanos, A. (2002). Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. iii. observation of streamlines and numerical simulation. *Phys. Rev. E*, 66(2), 026305–11.
- [Green et al., 2000c] Green, N. G., Ramos, A., & Morgan, H. (2000c). Ac electrokinetics: a survey of sub-micrometre particle dynamics. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 33(6), 632–641.
- [Honegger et al., 2011] Honegger, T., Berton, K., Picard, E., & Peyrade, D. (2011). Determination of clausius–mossotti factors and surface capacitances for colloidal particles. *Applied Physics Letters*, 98(18), 181906.
- [Huang & Pethig, 1991] Huang, Y. & Pethig, R. (1991). Electrode design for negative dielectrophoresis. *Measurement Science and Technology*, 2(12), 1142–1146.

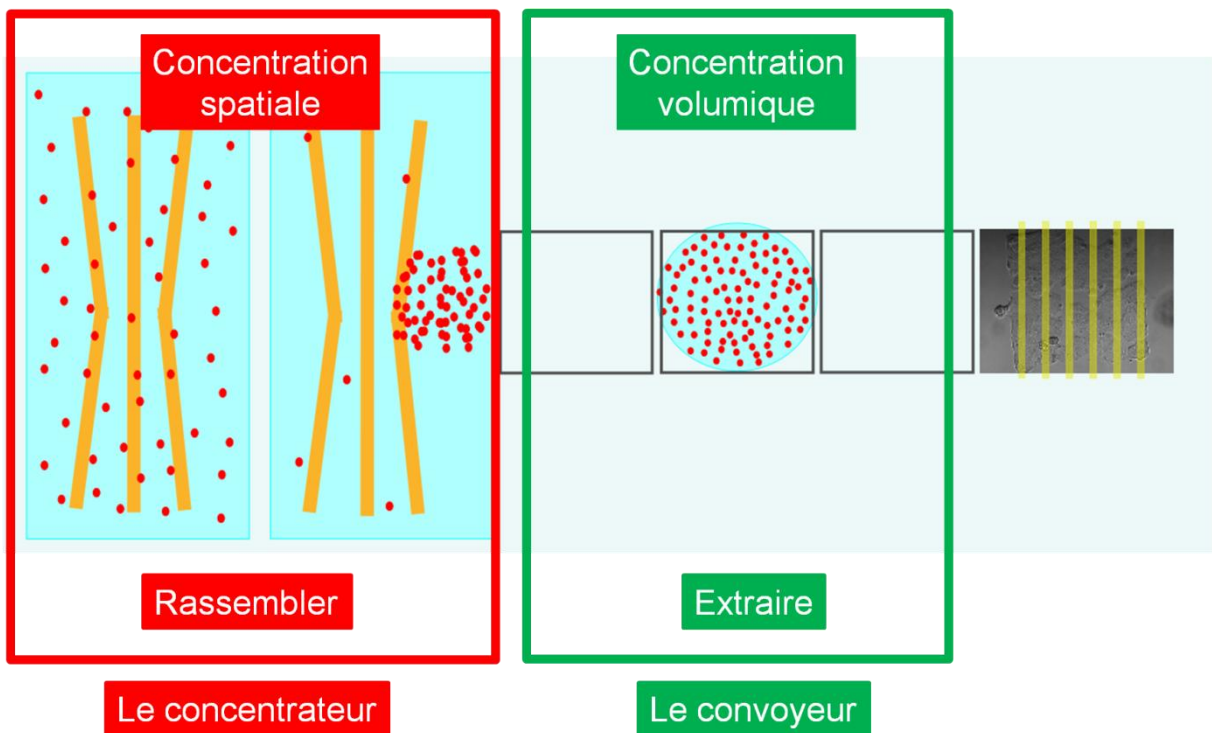
- [Hunt et al., 2008] Hunt, T. P., Issadore, D., & Westervelt, R. M. (2008). Integrated circuit/microfluidic chip to programmably trap and move cells and droplets with dielectrophoresis. *Lab Chip*, 8, 81–87.
- [Jang et al., 2009] Jang, L.-S., Huang, P.-H., & Lan, K.-C. (2009). Single-cell trapping utilizing negative dielectrophoretic quadrupole and microwell electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(12), 3637–3644.
- [Jones & Kallio, 1979] Jones, T. & Kallio, G. (1979). Dielectrophoretic levitation of spheres and shells. *Journal of Electrostatics*, 6(3), 207–224.
- [Lian et al., 2007] Lian, M., Islam, N., & Wu, J. (2007). Ac electrothermal manipulation of conductive fluids and particles for lab-chip applications. *Nanobiotechnology, IET*, 1(3), 36–43.
- [Lide, 2000] Lide, D. R. (2000). *CRC handbook of chemistry and physics*. 81st Edition, CRC Press, New-York.
- [Lin et al., 2007] Lin, Y., Shiomi, J., Maruyama, S., & Amberg, G. (2007). Electrothermal flow in dielectrophoresis of single-walled carbon nanotubes. *Phys. Rev. B*, 76(4), 045419–5.
- [Lyklema, 1995] Lyklema, J. (1995). *Fundamentals of interface and colloid science*. vol. 2, solid-liquid interface, Academic Press.
- [Melcher, 1981] Melcher, J. R. (1981). *Continuum Electromechanics*. The MIT Press, Cambridge, USA: The MIT Press.
- [Morgan & Green, 2003] Morgan, H. & Green, N. (2003). *AC Electrokinetics : Colloids and nanoparticles*. Research Studies Press.
- [Morganti & Morgan, 2011] Morganti, D. & Morgan, H. (2011). Characterization of non-spherical polymer particles by combined electrorotation and electroorientation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 376(1-3), 67–71.

- [Oh et al., 2009] Oh, J., Hart, R., Capurro, J., & Noh, H. M. (2009). Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform ac electric fields in a microchannel. *Lab Chip*, 9(1), 62–78.
- [Pinedo-Rivera, 2009] Pinedo-Rivera, T. (2009). *Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné : application en plasmonique*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- [Pohl, 1950] Pohl, H. (1950). The motion and precipitation of suspensions in divergent electric fields. *Journal of Applied Physics*, 22, 869.
- [Ramos et al., 1999a] Ramos, A., Morgan, H., Green, N., & Castellanos, A. (1999a). The role of electrohydrodynamic forces in the dielectrophoretic manipulation and separation of particles. *Journal of Electrostatics*, 47(1-2), 71–81.
- [Ramos et al., 1999b] Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., & Castellanos, A. (1999b). Ac electric-field-induced fluid flow in microelectrodes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 217(2), 420–422.
- [Ramos et al., 2005] Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., Gonzalez, A., & Castellanos, A. (2005). Pumping of liquids with traveling-wave electroosmosis. *Journal of Applied Physics*, 97(8), 084906.
- [Rosenthal & Voldman, 2005] Rosenthal, A. & Voldman, J. (2005). Dielectrophoretic traps for single-particle patterning. *Biophysical Journal*, 88(3), 2193–2205.
- [Squires, 2009] Squires, T. M. (2009). Induced-charge electrokinetics: fundamental challenges and opportunities. *Lab Chip*, 9, 2477–2483.
- [Stern, 1924] Stern, O. (1924). The theory of the electrical double-layer. *Z. Electrochem*, 30, 508–516.
- [Stratton, 1941] Stratton, J. (1941). *Electromagnetic Theory*. McGraw-Hill, New-York.
- [Thomas et al., 2009] Thomas, R. S., Morgan, H., & Green, N. G. (2009). Negative dep traps for single cell immobilisation. *Lab Chip*, 9, 1534–1540.

[Veas & Schaffer, 1929] Veas, F. & Schaffer, M. (1929). Stable levitation of a dielectric liquid in a multi frequency electric field. *Proc. Inter. Symp. On Electrohydrodynamics, Cambridge MA*, (pp. 113–115).

[Voldman et al., 2003] Voldman, J., Toner, M., Gray, M., & Schmidt, M. (2003). Design and analysis of extruded quadrupolar dielectrophoretic traps. *Journal of Electrostatics*, 57(1), 69–90.

4 : Résultats expérimentaux



4.1 Préambule

Les résultats de simulation numérique apportent des éléments quantitatifs pour le dimensionnement géométrique des électrodes du concentrateur. L'objectif est d'augmenter la taille du concentrateur afin qu'il soit compatible avec l'étape d'extraction de goutte par électromouillage. L'objectif du travail expérimental présenté dans ce chapitre est de valider l'étude numérique et de fabriquer un concentrateur optimisé. Ce concentrateur est ensuite testé dans plusieurs configurations.

Dans un premier temps, des concentrateurs de tailles diverses sont fabriqués sur un substrat. Le système possède plusieurs dizaines de réservoirs de différentes tailles comprenant des électrodes aux paramètres géométriques variables. Les tests sont menés avec des solutions de microparticules de latex en suspension dans de l'eau désionisée (EDI). Le but est de vérifier l'influence des paramètres géométriques. A l'issue de cette étude, un concentrateur aux performances optimisées est fabriqué. Il est intégré à un système de convoyage utilisant la technologie d'électromouillage. Ce système est finalement testé dans trois configurations.

La première configuration est l'emploi du concentrateur seul dans le but de mesurer son efficacité. Les tests sont effectués directement avec des oocystes de *Cryptosporidium parvum* en suspension dans un mélange d'eau et de KCl.

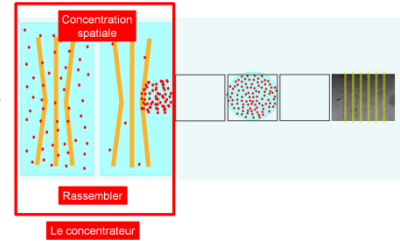
Dans la deuxième configuration, le concentrateur est couplé au convoyeur, ce qui permet d'extraire une goutte contenant une concentration plus élevée du parasite. Le système est employé en mode 'extracteur'. A partir du réservoir d'une capacité de 6 μ L (définie par la surface du concentrateur et la profondeur du réservoir fixé à 200 μ m), les oocystes sont concentrés sur le bord du réservoir puis extraits dans une goutte de 800nL à l'issue de l'étape de création de goutte. Le pouvoir concentrateur de l'extracteur est estimé par décompte manuel du nombre d'oocystes présents à la sortie du système.

Dans une troisième configuration, le système est utilisé dans un fonctionnement de 'séparateur'. En effet, la diélectrophorèse est une force proportionnelle au cube du rayon de la particule soumise au gradient de champ électrique et fonction des propriétés diélectriques de la particule. Des expériences de séparation sont menées avec deux genres de parasites

différents, dont la taille est très différente, puis avec des espèces diverses d'oocystes de *Cryptosporidium sp.* L'intérêt biologique de telles expériences est indéniable. En effet, un individu malade est généralement infecté par plusieurs parasites en même temps (Annexe A).

La dernière partie de ce chapitre est consacrée à des travaux préliminaires ayant pour objectif de cultiver des cellules eucaryotes sur des surfaces de taille micrométrique. Le but final est d'utiliser le tapis cellulaire comme révélateur de l'infectivité des parasites, offrant ainsi un outil pour tester l'effet de molécules désinfectantes ou de médicaments.

4.2 Etude multiparamétrique du concentrateur



4.2.1 Objectifs

Nous avons fabriqué sur un substrat un grand nombre de réservoirs (profondeur de $200\mu\text{m}$) dans lesquels nous avons testé différentes géométries de microélectrodes. Deux géométries sont étudiées dans le but d'évaluer leur influence sur le phénomène de concentration. L'objectif est d'extraire les paramètres géométriques optimaux à partir des observations et des résultats de simulation du chapitre 3 afin de créer un concentrateur optimisé ayant une grande surface.

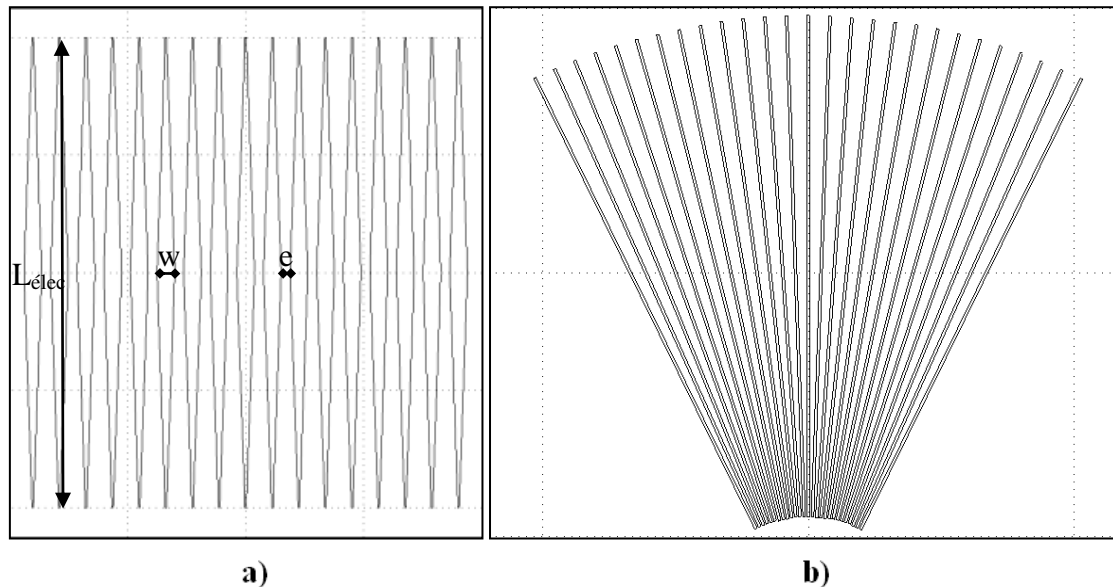


Figure 4.1 : Représentation schématique des géométries d'électrodes étudiées a): losange, b) éventail. L_{elec} est la longueur d'une électrode, w est la largeur d'une électrode, e est l'écart entre deux électrodes.

La première géométrie (figure 4.1.a) est une géométrie en forme de losange. La seconde géométrie (figure 4.1.b) est une géométrie en forme d'éventail.

Trois paramètres géométriques varient :

- L_{elec} : la longueur d'une électrode (équivalent à la longueur d'un puits)
- w : la largeur d'une électrode
- e : l'écart entre deux électrodes

Le paramètre L_{elec} varie de 1mm à 1cm. Les paramètres w et e varient de 10 à 200 μm . Les expériences sont menées sur les deux dispositifs. Nous avons fabriqué 90 puits avec la géométrie en forme de losange et 60 puits avec celle en forme d'éventail.

4.2.2 Présentation du banc de test

La partie électrique du banc de test (figure 4.3) se compose de :

- un générateur de fonctions arbitraires (AFG3021B, 25MHz, Tektronix)
- un amplificateur haute-tension (Tegam 2340, 50dBm, USA). La plage de tension en sortie de l'amplificateur varie alors entre 12,5 et 250V ($V = V_{pp}/2$)
- un support spécialement dédié (figure 4.2) contenant un connecteur souple de type zebra¹¹ (Silver Zebra connectors, Fujipoly, Royaume Uni) garantissant le contact électrique entre le générateur et les électrodes du dispositif
- un ordinateur pourvu du logiciel LabView[®] pour le pilotage des électrodes
- une carte relais composée de 24 relais électromécaniques
- une carte E/S (μDAQ 120A, Eagle Technology) qui fournissent en tension les électrodes du dispositif

¹¹ résistance entre les couches : 10^{12} Ohms

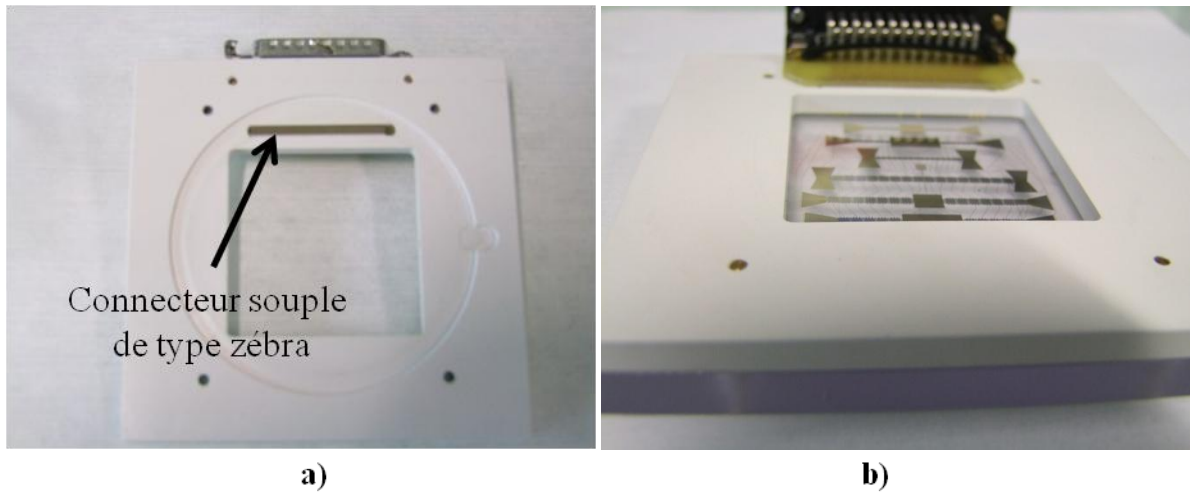


Figure 4.2 : Photos du support de connection du dispositif. a) Vue de la face inférieure du support sans dispositif. b) Vue de la face supérieure du support contenant le dispositif. Ce dernier est enserré entre le support en plastique blanc et une plaque en plexiglas[®] transparent.

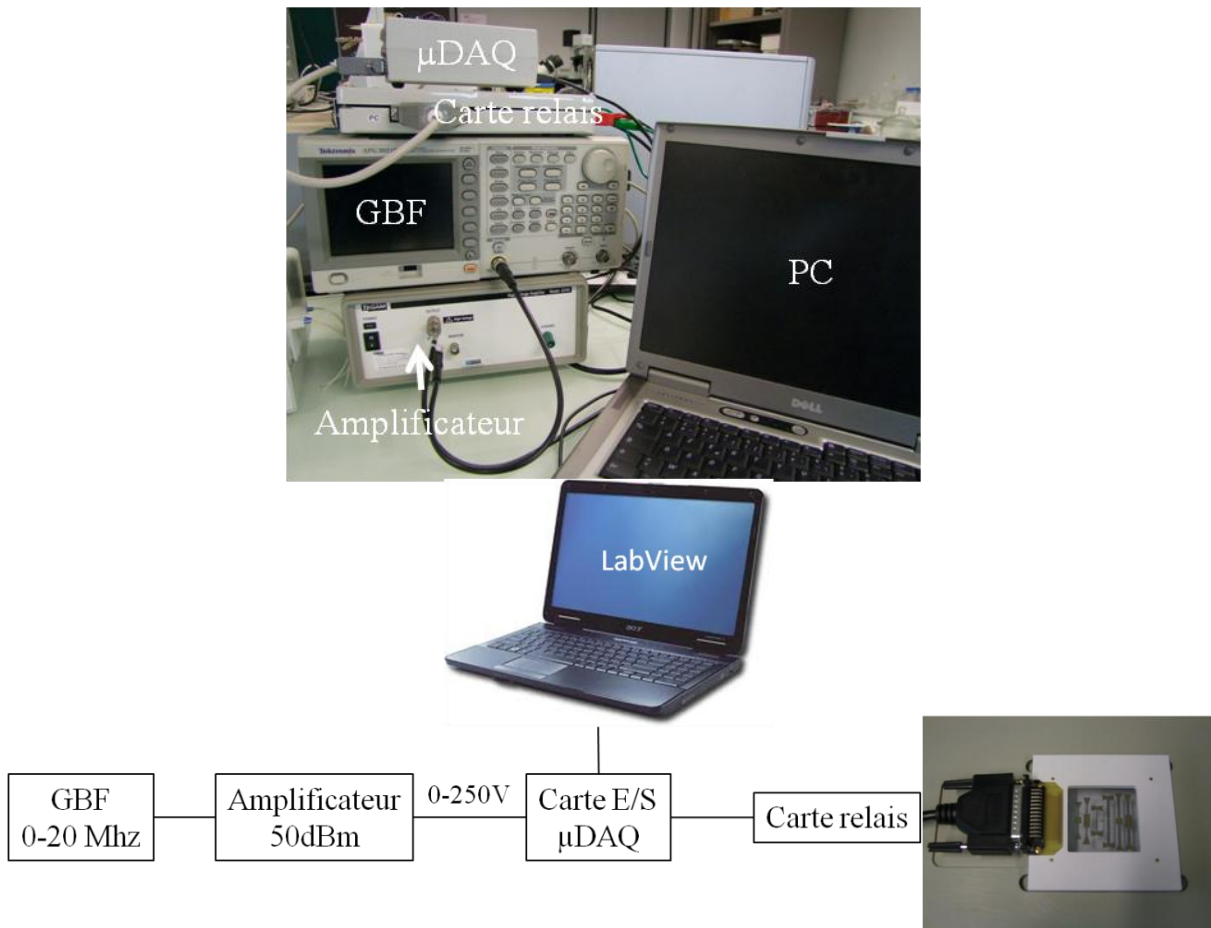


Figure 4.3 : Photo de la partie électrique du banc de test et le schéma bloc associé.

Les observations sont effectuées sous un microscope en réflexion (modèle Olympus BX41M) (figure 4.4).



Figure 4.4 : Le phénomène de concentration est observé au microscope en réflexion en lumière blanche.

4.2.3 Procédés de micro-fabrication

4.2.3.1 Fabrication du dispositif de concentration avec réservoir en SU8

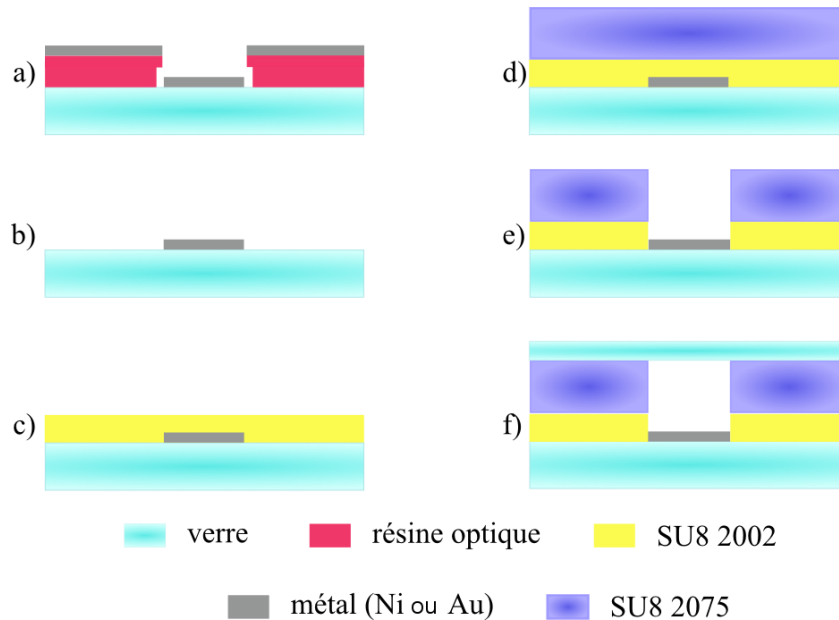


Figure 4.5 : Etapes du procédé de photolithographie pour la fabrication du dispositif de concentration multi-puits avec réservoir en SU8.

Le système utilisé est composé d'électrodes en or sur substrat de verre. Dans un premier temps (figure 4.5.a), une couche de résine AZnLof 2070 (MicroChemicals, Allemagne) de $7\mu\text{m}$ d'épaisseur est déposée par enduction centrifuge à une vitesse de 2 700 rotations par minute (rpm), une accélération de 1 000 rpm/s, pendant un temps de 30 secondes. Il s'ensuit une étape de recuit d'une période de 90 secondes sur plaque chauffante à une température de 110°C afin d'évaporer les solvants. Le substrat est insolé sous une lampe UV (longueur d'onde de 365nm, puissance de la lampe : $9\text{mW}/\text{cm}^2$) pendant 2,5s, au travers d'un masque optique mis en contact avec la résine. Ce masque est composé d'une plaque de quartz recouverte de chrome où sont gravés les motifs à transférer. Un deuxième recuit d'une minute à 110°C permet d'achever la polymérisation de la résine. Le substrat est ensuite plongé dans le développeur (AZ MIF 326, MicroChemicals, Allemagne) pendant 1min30s. Une fois que les motifs sont révélés, une couche d'accroche de chrome (épaisseur de 50nm) et une couche d'or (épaisseur de 250 nm) sont déposées par évaporation.

Après cette métallisation, la résine est dissoute dans un solvant (Remover PG, MicroChemicals, Allemagne) chauffé à 70°C. A la fin de cette étape, communément nommée lift off en micro-fabrication, il ne reste que les motifs métalliques sur le substrat (figure 4.5.b).

Une couche de SU8 2002 (MicroChem, USA) est déposée par enduction centrifuge afin de favoriser l'adhésion de la SU8 2075 (MicroChem, USA) (figure 4.5.c). Les paramètres d'enduction (3 000rpm, 1 000rpm/s, 30s) donnent une épaisseur de 2µm. Le recuit de la résine est réalisé pendant 2 minutes à 95°C. La résine SU8 2075 est déposée de la même façon avec une étape de pré-étalement (500rpm, 100rpm/s, 10s) due à sa forte viscosité. Après enduction (1 300rpm, 300rpm/s, 30 s), on obtient une couche de 200µm d'épaisseur (figure 4.5.d). Après recuit, la résine est insolée au travers d'un masque sous lampe UV (longueur d'onde de 365nm) pendant 8s pour une puissance de lampe de 10mW/cm². Un deuxième recuit est nécessaire avant la révélation de la résine. La révélation s'effectue pendant 1min30s dans un développeur dédié (SU8 Developer, MicroChem, USA) (figure 4.5.e). Elle est suivie d'un rinçage à l'isopropanol. Lors des expérimentations, le système est recouvert par un capot en verre (lame couvre objet), ou par un autre substrat transparent (figure 4.5.f).

Les étapes du procédé de fabrication des puits en SU8 demandent une grande précision dans leur exécution, en particulier pour la réalisation des recuits de la résine. Nous détaillons cela dans la partie suivante.

4.2.3.2 Dépôt et recuit pour la micro-structuration de la résine SU8-2075

La figure 4.6 schématise le procédé de dépôt de la résine sur le substrat de verre. Après avoir déposé la résine, directement à la bouteille pour éviter d'introduire des bulles d'airs, l'enduction centrifuge est lancée. Une fois que l'étalement est réalisé, la couche est laissée au repos pendant une heure afin que la résine relaxe. Au bout de ce temps, la résine est recuite sur plaque chauffante.

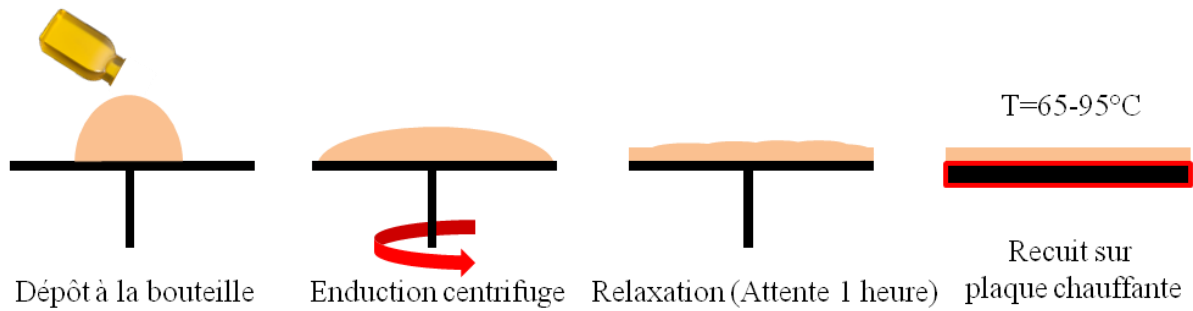


Figure 4.6 : Etapes du dépôt de la résine SU8-2075.

Le recuit de la résine SU8-2075 est une étape à réaliser avec précision. Lors de l'évaporation des solvants, du fait de la forte épaisseur et de la viscosité, il peut apparaître des inhomogénéités au niveau de la planéité de la surface de résine. Ces différences dans l'épaisseur de la couche (de l'ordre de la centaine de microns) sont le résultat d'une évaporation inhomogène des solvants contenus dans la résine. De plus, elles induisent des problèmes de collage entre le substrat et le masque lors de l'alignement durant l'étape d'insolation.

Enfin, un refroidissement trop brutal entraîne l'apparition de contraintes mécaniques dans la couche, ayant pour conséquence l'apparition de fissures. Ces cassures dans le matériau sont à proscrire car elles provoquent une baisse d'adhérence du matériau sur le substrat qui conduit à la délamination de cette couche lors de l'étape de développement.

Pour éviter ces deux problèmes majeurs, il est absolument nécessaire de contrôler très finement les étapes de recuit. Une étude a été menée sur la vitesse de montée en température (rampes en °C/heure), et sur les temps de recuit pour deux températures de recuit (65°C et 95°C) en employant une plaque chauffante programmable.

Des recuits longs à basse température ont montrés de bons résultats [Wacogne et al., 2008]. Les recommandations du constructeur stipulent un recuit en deux étapes (une étape courte à 65°C, une autre à 95°C).

Nous cherchons à améliorer la planéité de la surface tout en garantissant une évaporation des solvants assez importante pour que la résine ne colle pas au masque lors de l'alignement. Les

étapes de recuit ont été effectuées grâce à une plaque chauffante à rampe contrôlée de marque SAWATEC. Différentes vitesses de montée ont été testées pour des températures de recuit de 65°C et 95°C.

Dans un premier temps, nous avons choisi une température de 95°C (température conseillée par le constructeur). Pour un recuit de 50 minutes (temps conseillé par le constructeur), on observe l'apparition de trous dans la couche de résine pour une rampe de 240°C/heure. Par contre, l'évaporation des solvants est assez importante pour que la résine ne colle pas au masque lors de l'étape d'alignement/insolation. Une rampe plus faible de 90°C/heure améliore la planéité, mais le procédé n'est pas reproductible.

Les résultats à 95°C n'étant pas concluants, nous avons baissé la température à 65°C. Le recuit à 65°C présente les meilleurs résultats. L'inconvénient est que le temps de recuit est plus grand afin que les solvants puissent s'évaporer. L'emploi d'une rampe très faible (25°C/heure) associé à un temps de recuit de 3h à 65°C assure la planéité de la surface avec une évaporation suffisante des solvants, et ce de manière reproductible.

En résumé, le procédé de recuit optimisé se compose d'une montée en température d'une durée de 1h30. Un recuit de 3h à 65°C permet l'évaporation des solvants sans générer de trous à la surface. Le retour à la température ambiante s'effectue par convection naturelle pendant une heure. Après cette étape, le substrat peut être utilisé pour l'étape d'insolation. Après insolation, on effectue un recuit dont le temps de montée est de 15 minutes, le plateau à 65°C est de 1h30 et le temps de descente est de 15 minutes. L'étape de développement s'effectue une heure après la fin du recuit. Elle dure entre 15 et 20 minutes dans du SU8 Developer.

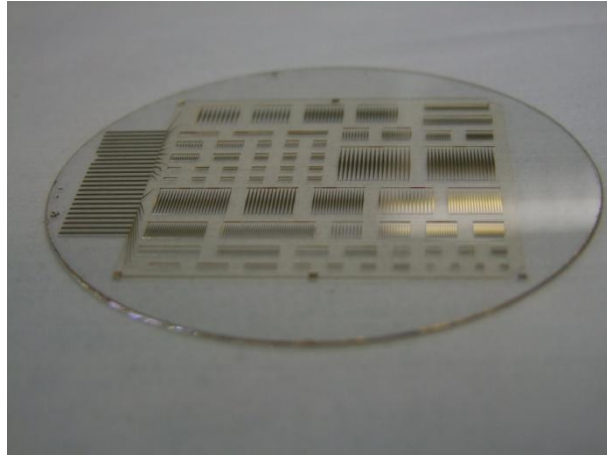


Figure 4.7 : Photo du dispositif de concentration avec puits en SU8 comprenant diverses tailles de réservoirs.

4.2.4 Méthodologie de l'expérience

Une goutte de liquide contenant les particules en suspension est déposée dans le puits. Le volume déposé varie de 0,5 à 10 μL selon la taille du puits. Le diamètre des particules employées varie de 1 à 20 μm (1 μm , 4.5 μm , 10 μm , 15 μm et 20 μm). Ces particules sont en polystyrène (Polysciences Europe GmbH, Allemagne). La concentration des échantillons est de 1000 particules/ μL pour une observation confortable au microscope. La conductivité du liquide est celle de l'eau désionisée (eau DI); elle est mesurée grâce à un conductimètre (Consort C533) et sa valeur est de quelques 10^{-4} S/m. Ce choix est conditionné par le travail préliminaire réalisé dans la thèse de Timothée Houssin qui indique qu'il faut travailler dans l'eau DI pour pouvoir compter les parasites [Houssin et al., 2010, Houssin, 2011]. Les particules sont lavées 3 fois par centrifugation dans de l'eau DI. Une goutte de solution de particules en suspension est déposée dans le puits, puis recouverte par une lame couvre objet. La tension est appliquée directement après le dépôt de l'échantillon.

4.2.5 Observations et discussion du dispositif multi-puits

4.2.5.1 Observations et discussion

4.2.5.1.1 Influence de la taille des particules

Ces expériences sont menées avec des liquides de faibles conductivités (10^{-4} S/m). La tension électrique appliquée aux électrodes est de 50V. Le choix de la fréquence de travail dépend du comportement diélectrophorétique de la particule. Nous rappelons que la concentration s'opère à la condition que les particules lèvitent, autrement dit, que le régime de diélectrophorèse soit négatif.

Le tableau 4.1 montre que les particules de latex de plus de $10\mu\text{m}$ de diamètre ont un comportement de diélectrophorèse négative quelque soit la fréquence. Pour les particules plus petites, il faut choisir la fréquence de façon à être dans un régime de diélectrophorèse négative.

1μ de diamètre	4.5μ de diamètre	10μ de diamètre	15μ de diamètre	20μ de diamètre
Fc=1.2MHz	Fc=100kHz	nDep sur tout le spectre	nDep sur tout le spectre	nDep sur tout le spectre

Tableau 4.1 : Fréquence de coupure du changement de comportement diélectrophorétique (passage d'un comportement positif à un comportement négatif) pour différents diamètres de particules de polystyrène en suspension dans un liquide de faible conductivité (10^{-4} S/m).

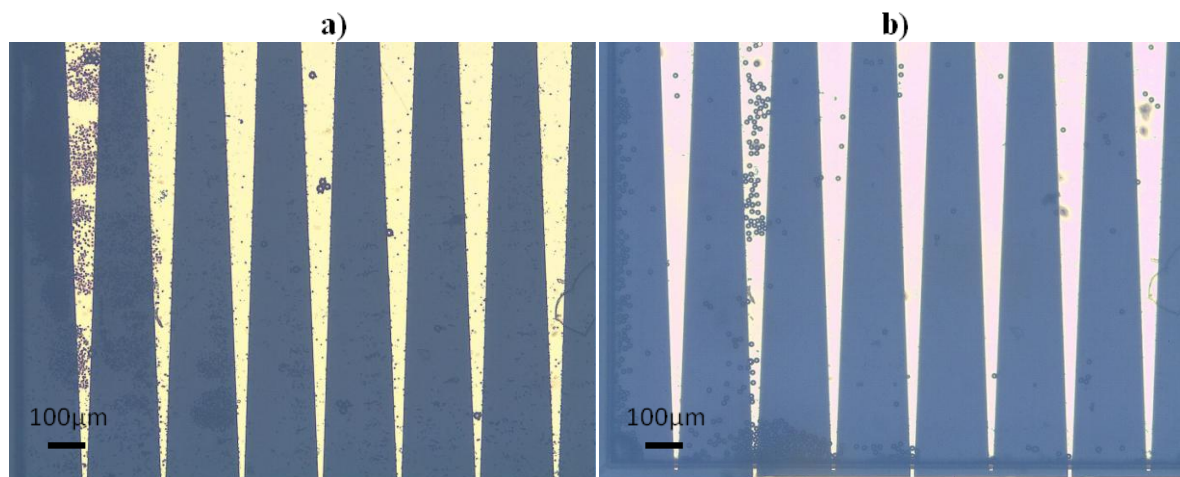


Figure 4.8 : Photographie d'un système d'électrodes en forme de losange utilisé pour une expérience de concentration de particules. a) Diamètre des particules : $4,5\mu\text{m}$ ($V=50\text{V}$, $f=300\text{kHz}$). b) Diamètre des particules : $15\mu\text{m}$ ($V=50\text{V}$, $f=10\text{kHz}$).

Nos observations montrent que pour un diamètre de particule supérieur ou égal à $4.5\mu\text{m}$ (ce qui est le cas des oocystes de *Cryptosporidium sp.*), la taille de la particule n'a pas d'influence sur le phénomène de concentration dès lors que la fréquence choisie crée les conditions pour l'établissement d'un régime de diélectrophorèse négative (figure 4.8).

Dans le cas de particules de $1\mu\text{m}$ de diamètre, nous n'avons pas observé de concentration. Ceci s'explique par le fait qu'à haute fréquence ($>1,2\text{MHz}$) et pour la conductivité choisie (10^{-4} S/m), l'effet électrothermique AC est plus faible. La figure 4.9 illustre l'influence de la fréquence sur l'amplitude de l'effet électrothermique AC. L'augmentation de la fréquence modifie l'équilibre des forces qui s'appliquent à la particule et l'effet concentrateur est modifié. Pour obtenir la concentration de particules de $1\mu\text{m}$ de diamètre, il faut augmenter la conductivité du milieu afin de diminuer la fréquence de coupure du régime de diélectrophorèse, et d'augmenter l'amplitude de l'effet électrothermique AC.

Dans le cas des particules de $4,5\mu\text{m}$ de diamètre, nous observons la concentration pour un signal de 300kHz . Cette fréquence est supérieure à la fréquence de coupure du changement de comportement diélectrophorétique, ce qui implique un régime de nDEP.

Dans le cas des particules de $15\mu\text{m}$ de diamètre, le régime nDEP existe pour toutes les fréquences et nous observons la concentration pour un signal de 10kHz .

A la lumière de ces observations, le choix de la fréquence du signal d'excitation est très important, et s'effectue selon la conductivité du milieu, des propriétés diélectriques et de la taille du type de particules à concentrer.

4.2.5.1.2 Influence de la géométrie des électrodes

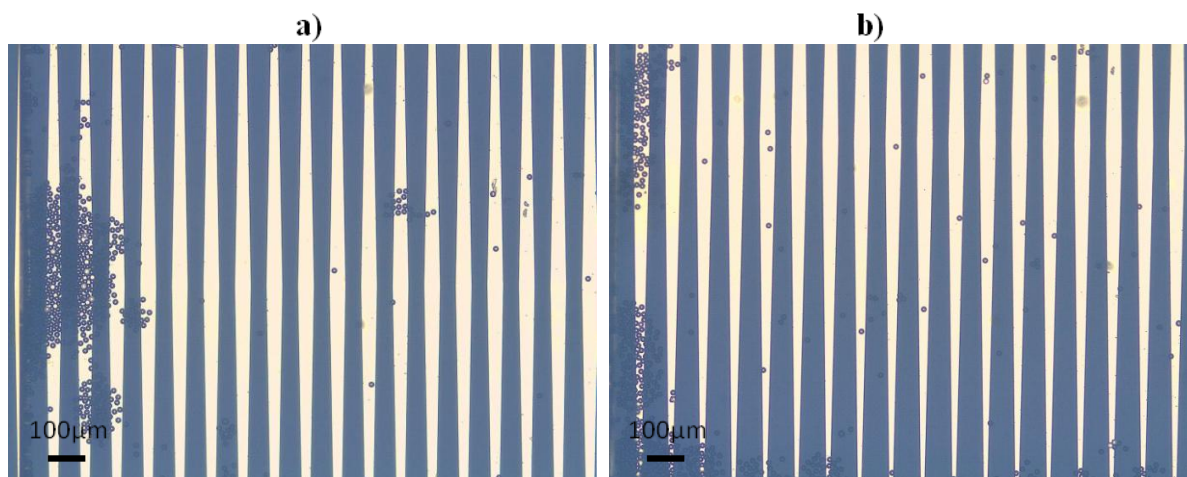


Figure 4.9 : Photographie du système d'électrodes en forme de losange de $45\mu\text{m}$ de large avec un écart de $45\mu\text{m}$ pour réaliser une expérience de concentration de particules de $10\mu\text{m}$ de diamètre dans de l'eau DI. a) $V=50\text{V}$, fréquence de 10kHz , b) $V=50\text{V}$, fréquence de 100kHz .

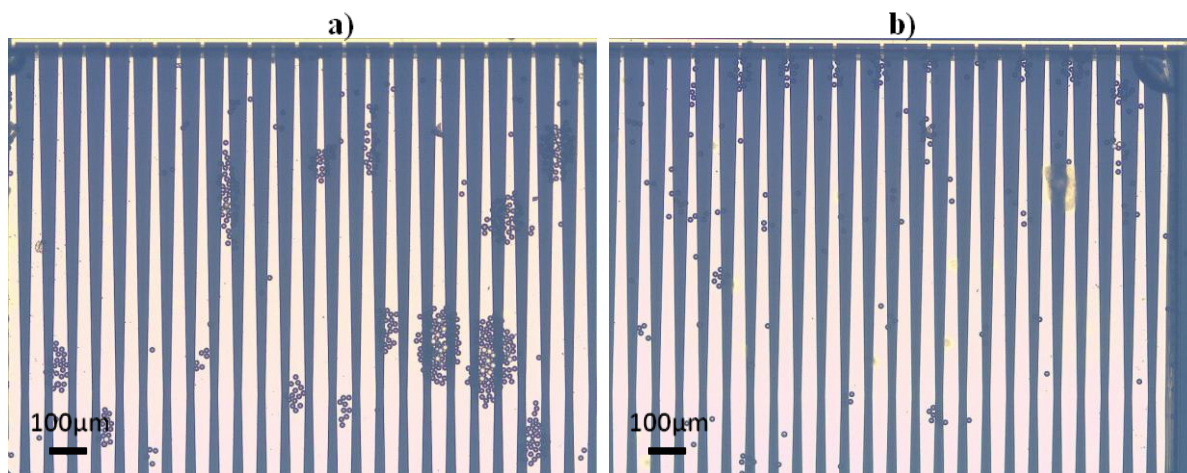


Figure 4.10 : Photographie du système d'électrodes en forme de losange de $45\mu\text{m}$ de large avec un écart de $22,5\mu\text{m}$ pour réaliser une expérience de concentration de particules de $10\mu\text{m}$ de diamètre dans de l'eau DI. a) $V=50\text{V}$, fréquence de 10kHz , b) $V=50\text{V}$, fréquence de 100kHz .

Nous étudions maintenant l'influence de la géométrie des électrodes sur le pouvoir concentrateur. Nous avons fait varier les largeurs des électrodes (w) et les espaces inter-électrodes (e). Les figures Figure 4.9 et Figure 4.10 correspondent à une forme géométrique de type losange pour laquelle $w=45\mu\text{m}$ et $e=45\mu\text{m}$ (figure 4.9), ou $w=45\mu\text{m}$ et $e=22,5\mu\text{m}$ (figure 4.10). Dans le cas où les électrodes sont proches (figure 4.10), l'effet électro-osmotique prédomine (cf. chapitre 3 section 3.3.2). Il se caractérise par la formation de petits amas de particules. Le simple fait d'augmenter cet écart permet d'aboutir à une concentration efficace (figure 4.9). Ce changement de géométrie est beaucoup plus pertinent que le changement de fréquence.

Si on écarte trop les électrodes ($e/w > 2$ pour $w > 100\mu\text{m}$, cf. chapitre 3 section 3.3.3) la gravité devient un phénomène perturbateur. La figure 4.11 présente les résultats d'une expérience de concentration pour une géométrie en forme de losange telle que $w=185\mu\text{m}$ et $e=92,5\mu\text{m}$ (figure 4.11.a), et $e=185\mu\text{m}$ (figure 4.11.b). Nous observons sur la figure 4.11 qu'un grand nombre de particules sédimentent entre les électrodes. Cet effet est d'autant plus important que la largeur des électrodes est grande.

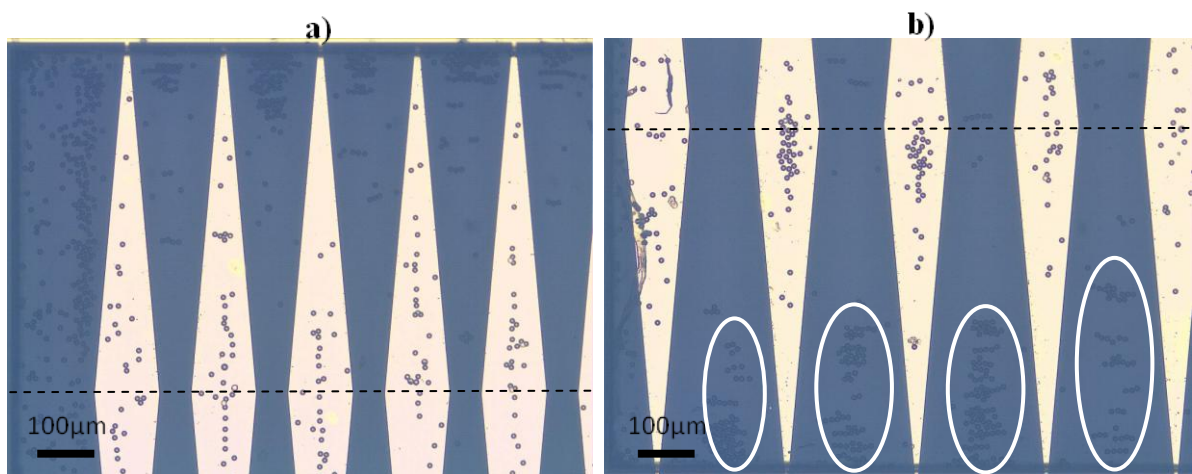


Figure 4.11 : Photographie d'un système d'électrodes en forme de losange utilisé pour une expérience de concentration de particules (diamètre $10\mu\text{m}$) dans de l'eau DI ($V=50\text{V}$, $f=100\text{kHz}$) : a) $L_{\text{elec}}=2\text{mm}$, $w=185\mu\text{m}$, $e=92,5\mu\text{m}$ et espace inter-électrodes maximum= $260\mu\text{m}$. b) $L=2\text{mm}$, $w=185\mu\text{m}$ $e=185\mu\text{m}$ et espace inter-électrodes maximum= $360\mu\text{m}$.

Lorsque l'on élargit le réservoir et que l'on multiplie le nombre d'électrodes, nous observons toujours ces phénomènes de concentration, avec la même influence des différents paramètres sur l'efficacité de la concentration (figure 4.12). Bien entendu, la concentration aux bords du réservoir est plus longue à obtenir étant donné les dimensions du réservoir.

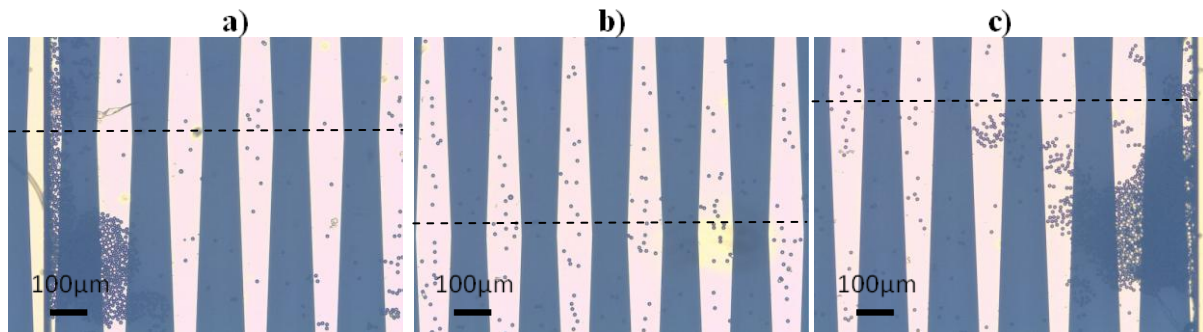


Figure 4.12 : Photographie d'un système d'électrodes en forme de losange utilisé pour une expérience de concentration de particules (diamètre $10\mu\text{m}$) dans de l'eau DI ($V=50\text{V}$, $f=100\text{kHz}$). $L_{\text{elec}}=4\text{mm}$, $w=150\mu\text{m}$, $e=150\mu\text{m}$. Les motifs se répètent sur une distance de 12mm (40 électrodes). a-c) bord du réservoir : les particules sont concentrées dans ces deux zones extrêmes. b) zone centrale du réservoir : les particules sont peu nombreuses.

De la même manière, des expériences de concentration (durée : 10 minutes) sont menées sur les systèmes d'électrodes en forme d'éventails. La figure 4.13 montre le résultat d'une expérience de concentration sur un système d'électrodes en forme d'éventail avec $w=50\mu\text{m}$, $e=50\mu\text{m}$. L'espace inter-électrodes maximum est de $190\mu\text{m}$, ce qui correspond à $e/w < 4$.

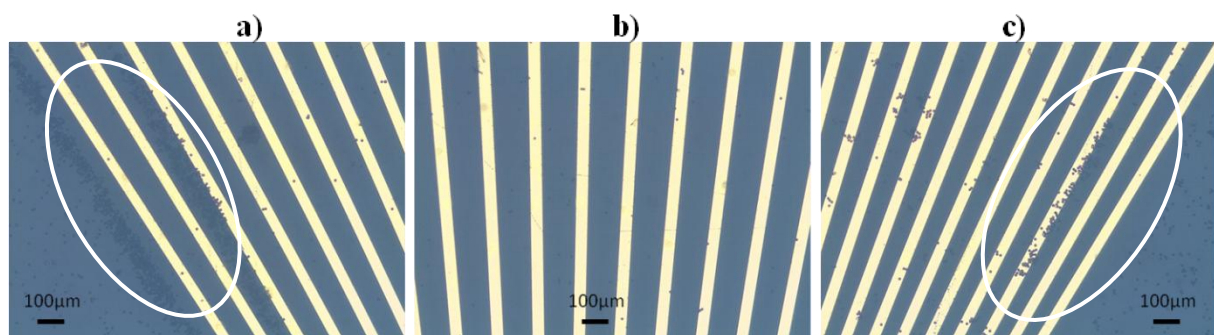


Figure 4.13 : Photographie d'un système d'électrodes en forme d'éventail utilisé pour une expérience de concentration de particules (diamètre $10\mu\text{m}$) dans de l'eau DI ($V=50\text{V}$, $f=100\text{kHz}$). $L_{\text{elec}}=4\text{mm}$, $w=50\mu\text{m}$, $e=50\mu\text{m}$ et espace inter-électrodes maximum= $190\mu\text{m}$

($e/w < 4$). a-c) Les particules sont rassemblées sur les bords de l'éventail. b) Au centre de l'éventail, les particules sont peu nombreuses.

Les particules sont rassemblées sur les bords du profil en éventail (figure 4.13.a et c). Au centre du profil en éventail, il y a très peu de particules présentes (figure 4.13.b). Elles ont lévités et ont été emportés par les courants d'électroconvection.

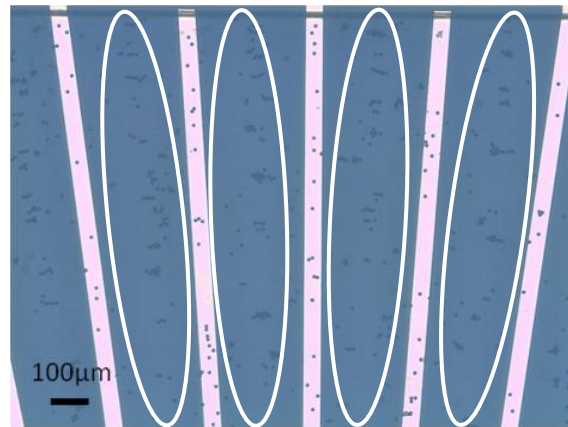


Figure 4.14 : Photographie d'un système d'électrodes en forme d'éventail utilisé pour une expérience de concentration de particules (diamètre $10\mu\text{m}$) dans de l'eau DI ($V=50\text{V}$, $f=100\text{kHz}$). $L_{\text{elec}}=4\text{mm}$, $w=50\mu\text{m}$, $e=50\mu\text{m}$ et espace inter-électrodes maximum= $330\mu\text{m}$ ($e/w > 4$).

Lorsque le rapport e/w est supérieur à 4 dans une zone du puits, le phénomène de sédimentation est prépondérant (figure 4.14). Les particules présentes dans ces zones sédimentent.

Enfin, la figure 4.15 montre le résultat d'une expérience de concentration sur une géométrie en éventail avec $w=20\mu\text{m}$ et $e=10\mu\text{m}$. Il existe deux zones très distinctes. Un premier espace est complètement vide de particules, ne subsistent que quelques amas caractéristiques de courants électro-osmotiques. Une deuxième zone est concentrée en particules. Ces observations démontrent clairement l'influence de l'écart inter-électrodes sur l'amplitude de la force électro-osmotique. Il est observé que pour un rapport e/w inférieur à 1, l'amplitude de l'effet électro-osmotique domine les autres phénomènes.

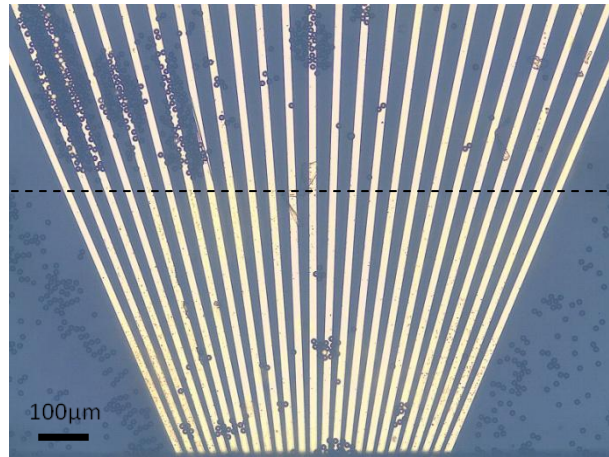


Figure 4.15 : Photographie d'un système d'électrodes en forme d'éventail utilisé pour une expérience de concentration de particules (diamètre $15\mu\text{m}$) dans de l'eau DI ($V=50\text{V}$, $f=100\text{kHz}$). $L_{\text{elec}}=6\text{mm}$, $w=20\mu\text{m}$, $e=10\mu\text{m}$. La zone sous la ligne pointillée est dominée par les effets électro-osmotiques du fait du faible écart inter-électrodes. Par conséquent, les particules sont peu nombreuses et se regroupent en petits amas.

4.2.5.2 Conclusion

Cette étude expérimentale montre la forte influence de la géométrie des électrodes sur l'équilibre des phénomènes impliqués lors de la concentration de particules en suspension dans un liquide. Cette étude vérifie l'analyse numérique faite dans le chapitre 3.

La largeur des électrodes et l'écart entre les électrodes sont les paramètres géométriques majeurs capables de moduler l'amplitude des effets électrocinétique en jeu.

Un des résultats importants est l'influence de l'écart inter-électrodes (e) sur la mise en place de l'effet électro-osmotique. L'électro-osmose est un phénomène destructeur de l'effet concentrateur du système. Il est primordial de se placer dans des conditions expérimentales le limitant le plus possible. Il est observé que le simple fait d'augmenter l'écart inter-électrodes diminue l'effet électro-osmotique, au point de le rendre négligeable devant l'effet électrothermique AC. Pour un rapport e/w supérieur ou égale à 1, l'effet électro-osmotique est dominé par les autres phénomènes.

Le deuxième résultat est la quantification des paramètres géométriques limites (e et w) pour limiter la sédimentation des particules. La sédimentation des particules est le deuxième phénomène destructeur de l'effet concentrateur du système. Pour que la sédimentation ne soit pas l'effet dominant, la largeur d'une électrode ne doit pas dépasser $150\mu\text{m}$ et l'espace entre les électrodes ne doit pas être supérieur à 4 fois la largeur de l'électrode (pour une largeur inférieure à $100\mu\text{m}$), et 2 fois la largeur (pour une largeur supérieure à $100\mu\text{m}$). Ces observations valident les conclusions issues de l'étude des simulations numériques du chapitre 3.

Les règles de dimensionnement établies ci-dessus s'appliquent aux deux types de géométries (losange et éventail).

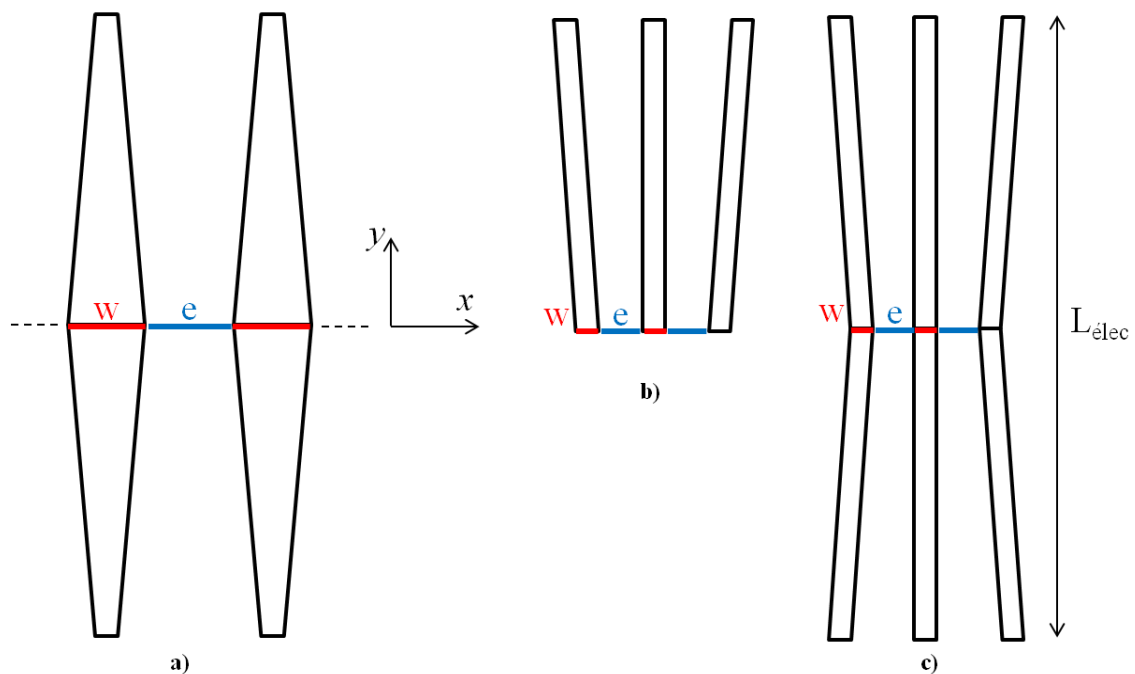


Figure 4.16 : Schéma des types de géométries pouvant être optimisés. a) Géométrie en losange. b) Géométrie en éventail. c) Géométrie en éventail symétrisé.

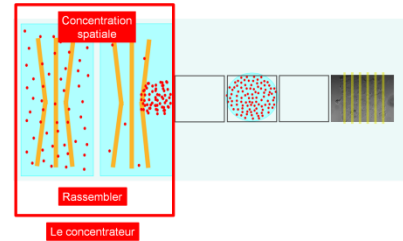
La figure 4.16 montre les types de géométries qu'il est possible d'optimiser. L'optimisation de la forme losange consiste en l'augmentation de $L_{\text{élec}}$ et la répétition des motifs selon l'axe x (figure 4.16.a). L'optimisation de la forme éventail consiste principalement en l'augmentation de $L_{\text{élec}}$ (figure 4.16.b).

Cependant, pour la géométrie en forme de losange, il est difficile de respecter les conditions sur e et w si $L_{\text{élec}}$ est supérieur à 4mm. Il est possible de répéter les motifs selon l'axe x sur des distances de l'ordre du centimètre mais cela augmente considérablement le temps nécessaire à la concentration.

L'avantage de la géométrie en éventail est que l'on peut augmenter $L_{\text{élec}}$ en construisant son image par symétrie suivant l'axe x (figure 4.16.c). Ainsi, nous pouvons respecter les conditions sur e et w pour favoriser la concentration, tout en agrandissant considérablement la surface de travail.

Ainsi, la forme des électrodes en éventail symétrique est la géométrie idéale. Nous avons sélectionné cette géométrie ($L_{\text{élec}}$ vaut 8mm, w est égal à 30 μm , e est égal à 30 μm et l'espace inter-électrodes maximum est de 100 μm) pour les expériences de concentration, d'extraction et de séparation. La surface totale est de 28 mm².

4.3 Le concentrateur optimisé



4.3.1 Objectifs

Il s'agit de tester le concentrateur optimisé, intégré sur une base dédiée au déplacement de gouttes par électromouillage. Le premier objectif est de caractériser l'efficacité du concentrateur en éventail. Le deuxième objectif est de valider la technologie d'intégration du concentrateur avec le système de convoyage par électromouillage (EWOD). Les expériences sont effectuées avec le même banc de test que celui décrit précédemment. Les observations sont effectuées sous un microscope Nikon (modèle Eclipse 80i).

Le système se compose de deux parties. La première partie est un ensemble de microélectrodes en nickel enfouies sous une couche diélectrique. Le choix de ce métal est guidé par le fait qu'il est translucide pour les épaisseurs (20nm) que l'on dépose. Ceci permet d'observer le déplacement des gouttes. Cet ensemble est dédié au déplacement de goutte par EWOD. La deuxième partie se compose du concentrateur constitué d'électrodes en or. Cette deuxième partie est fabriquée directement sur la partie EWOD. Les électrodes en or en contact avec l'électrolyte sont plus robustes sous des tensions élevées que le nickel. En effet nous avons parfois observé la destruction des électrodes en nickel. Les étapes de micro-fabrications sont décrites dans la section suivante.

4.3.2 Procédés de micro-fabrication

La figure 4.17 donne une vue schématique du système (4.17.a vue de dessus, 4.17.b vue de côté). Le convoyeur est constitué d'électrodes planaires en nickel dessinées sur un substrat de verre. Ces électrodes sont recouvertes d'une couche de SU8 2002. Cette couche est utilisée en tant que diélectrique ($\epsilon_r=3,2$ à 10MHz). Sur cette couche sont fabriquées le système d'électrode du concentrateur et les lignes de masse en or.

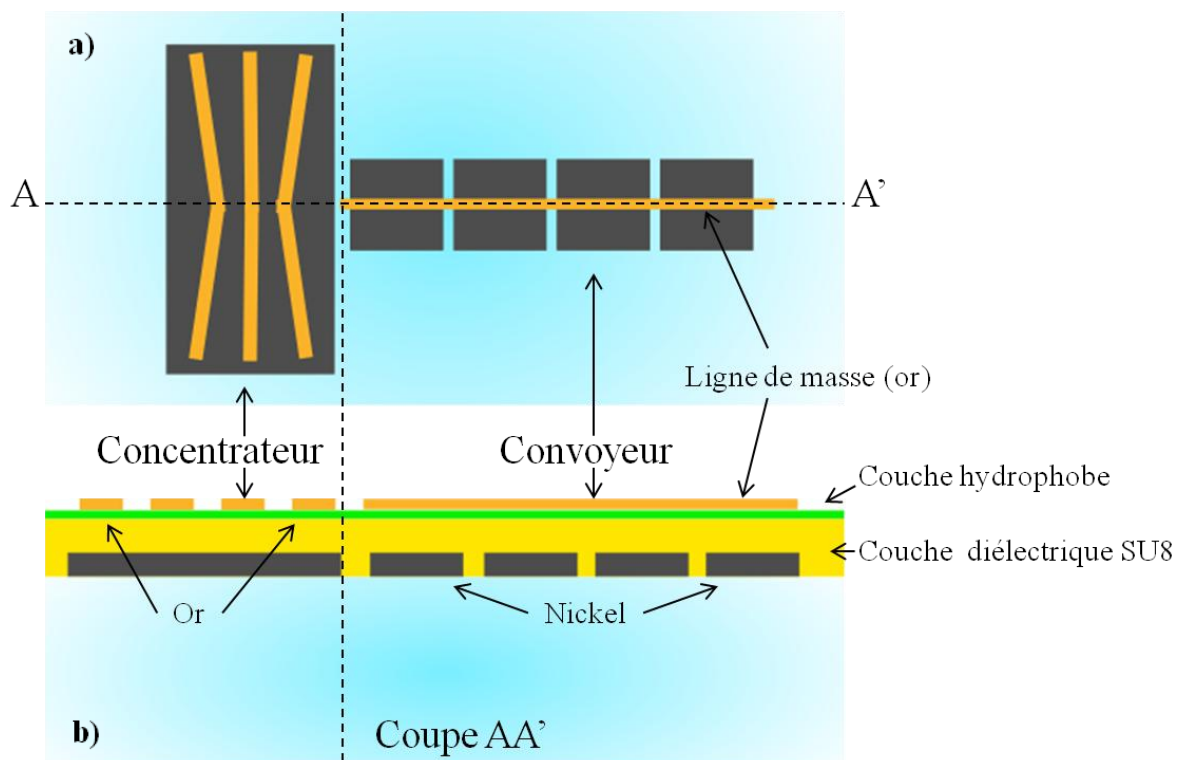


Figure 4.17 : Schéma vue de dessus (a) et en coupe (b) du système.

Le choix d'un matériau photosensible tel que la SU-8 permet d'obtenir, après exposition et révélation, une couche isolante de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur sur les électrodes conductrices tout en conservant un accès aux connexions électriques des électrodes (zones non exposées aux UV).

Une couche de Cytop (CTL-809M de la société AGC, Japon) est déposée par enduction centrifuge sur l'ensemble du substrat de verre. Elle permet de rendre la surface du système de convoyage hydrophobe, condition nécessaire au fonctionnement de l'électromouillage. La figure 4.18 décrit les différentes étapes de fabrication de ce système.

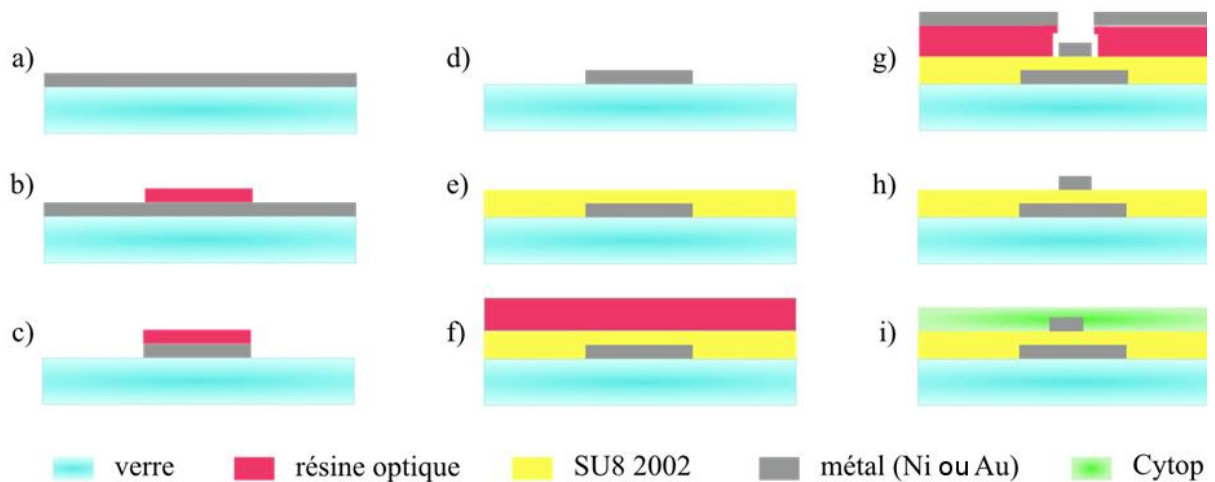


Figure 4.18 : Etapes du procédé de fabrication du système de concentration et de convoyage.

Une première couche métallique en nickel de 20nm d'épaisseur est déposée par pulvérisation cathodique sur la totalité du substrat de verre (figure 4.18.a). Le motif des électrodes est réalisé par lithographie optique à l'aide d'une résine positive (AZ1518, MicroChemicals, Allemagne) (figure 4.18.b). Les paramètres d'enduction, de recuit, d'insolation et de développement sont dans le tableau ci-dessous. Le développement s'effectue avec le développeur AZ726 MIF (MicroChemicals, Allemagne).

Resine	Enduction	Recuit 1	Insolation	Recuit 2	Révélation
AZ 1518	4 400rpm, 2 000rpm/s, 30s	60sec@110°C	1 seconde longueur d'onde : 400nm Puissance de la lampe : 14 mW	1min@110 °C	1min30sec dans AZ726 MIF

Le nickel est ensuite gravé chimiquement dans un mélange d'eau et d'acide nitrique (HNO₃/H₂O 1:3 v/v) pendant une minute (figure 4.18.c). Après gravure, la résine est dissoute à l'acétone (figure 4.18.d). Le substrat est rincé à l'alcool isopropylique et séché à l'azote.

Une couche de SU8-2002 (MicroChem, USA) de 2µm d'épaisseur est déposée par enduction centrifuge (3 000rpm, 1 000rpm/s, 30s), recuite pendant 1 minute à 95°C, puis insolée pendant 8 secondes sous lampe UV (longueur d'onde : 365nm, puissance : 10mW/cm²) (figure 4.18.e). L'insolation de la SU8 se fait sans masque. Les connections sont cachées par

du papier mylar. Un deuxième recuit de 2 minutes à 95°C précède l'étape de développement d'une durée d'une minute dans du SU8 Developer (MicroChem, USA). Cette couche joue le rôle de couche diélectrique pour le phénomène d'électromouillage. Elle couvre l'ensemble du substrat, excepté la surface dédiée aux contacts électriques. Afin de polymériser le matériau et qu'il ne se dissolve pas dans les solvants utilisés dans la suite du procédé, nous effectuons un recuit (hard bake) à 180°C pendant 30 minutes, puis une insolation avec les paramètres précédents.

Sur cette couche diélectrique sont fabriquées les électrodes en or du concentrateur et les lignes de masse (figure 4.18.f-h). Ces étapes sont les mêmes que les étapes de lift off décrites dans la section 1.3.1 de ce chapitre.

Enfin, le Cytop est déposé par enduction centrifuge (1500rpm, 300rpm/s, 30s) sur l'ensemble du substrat pour l'obtention d'une couche hydrophobe d'une épaisseur de 30nm (figure 4.18.i). Pour ce faire, le Cytop CTL-809M est dilué dans le CT-Solv 180, son solvant associé (dilution CTL-809M dans solvant 1:10 (v/v)). La couche de Cytop est recuite au four à 180°C pendant 30 minutes. La figure 4.19 montre le dispositif final.

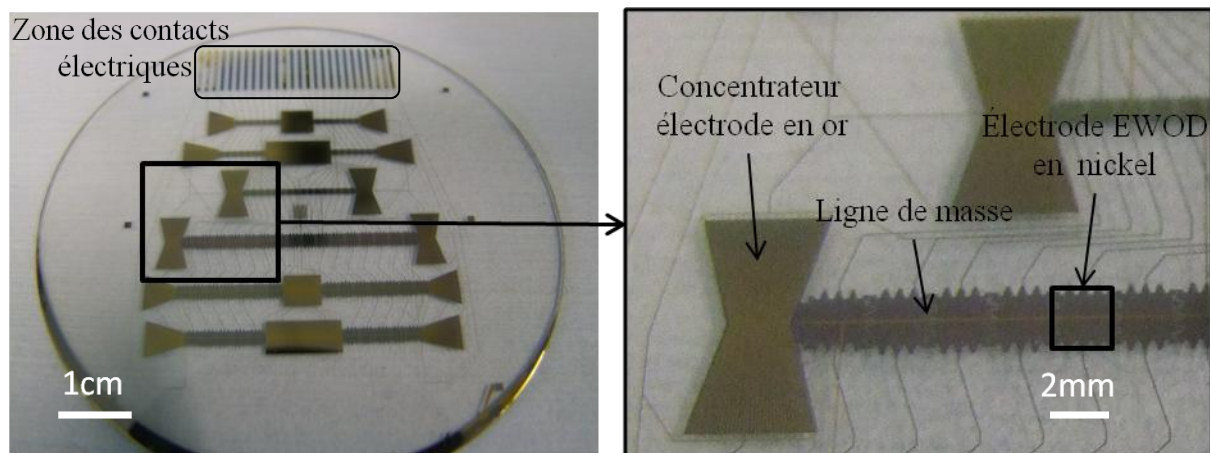


Figure 4.19 : Photographie du substrat de verre sur lequel ont été fabriqués les systèmes de concentration et de convoyage.

Nous constatons sur cette figure que différents systèmes de concentration et de convoyage ont été testés. Trois types de concentrateurs sont présents : en forme de losange, d'éventail et d'éventail symétrique. Deux types d'électrodes carrés ($L_{ewod}=1\text{mm}$ et $L_{ewod}=2\text{mm}$) ont été intégrés.

4.3.3 Méthodologie des expériences

La préparation des échantillons s'effectue sous une hôte à aspiration laminaire en laboratoire de classe de confinement 2 (L2) du fait du pouvoir pathogène du parasite. Les protocoles de manipulations sont stricts (changement de gants dès que les mains sortent de la hôte, poubelles dédiées pour chaque type de déchet) et les règles d'hygiènes draconiennes. A la fin d'une série d'expériences, le substrat doit être laissé à sécher à l'air libre pendant 24h afin de s'assurer de la mort par dessiccation des parasites résiduels.

Une solution d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* (souche IOWA, Waterborne Inc, New Orleans, USA) est préparée dans une solution saline de KCl dont la conductivité est de 0,015S/m. Les oocystes sont lavés par centrifugation de 10 minutes à 3 000g. Le marquage des oocystes est effectué avec des anticorps anti-Cryptosporidium marqués avec des fluorochromes (Crypt-a-Glo, A400Cy3, Waterborne Inc, New Orleans, USA) dilués au 1/20ième pendant 1h à 37°C à l'abri de la lumière selon les recommandations du fournisseur. Les oocystes sont à nouveau lavés par 3 centrifugations et reprises du culot dans la solution saline. Le décompte des oocystes sur hémocytomètre (cellule de Malassez) indique une concentration de 250 à 1 000 oocystes par μL selon les expériences.

Une goutte 10 μL de cette solution en parasites est déposée sur le dispositif à tester de sorte que la goutte recouvre la totalité de la surface du concentrateur lorsqu'elle est encapsulée. Par souci de simplification de la fabrication, les puits en SU8 sont remplacés par des morceaux de silicium de 200 μm d'épaisseur déposés directement sur le substrat de verre. Ils jouent le rôle de cales et définissent la hauteur de la goutte. La goutte est recouverte par une lame couvre objet déposée sur les cales. Le système est branché au générateur de tension et à l'amplificateur *via* la carte relais. Le signal délivré est un signal sinusoïdal de 25V à 300kHz. Le temps de l'expérience est de 10 minutes. Le dispositif est placé sous le microscope à épifluorescence pour l'observation des oocystes par le dessus. Ceci permet de voir tous les oocystes présents, même ceux situés au-dessus des électrodes (ce que n'aurait pas permis une observation en transmission en lumière blanche).

A la fin du processus, les oocystes sédimentent après coupure de l'excitation électrique, puis les photos sont prises grâce au logiciel d'acquisition de la caméra du microscope à fluorescence (NIS Element 3.2). L'image globale du réservoir est recréée à l'aide du logiciel Photoshop[®]. Les particules sont comptées manuellement grâce au décompteur de particules du logiciel ImageJ[®].

4.3.4 Observations et discussion du concentrateur optimisé

4.3.4.1 Observations

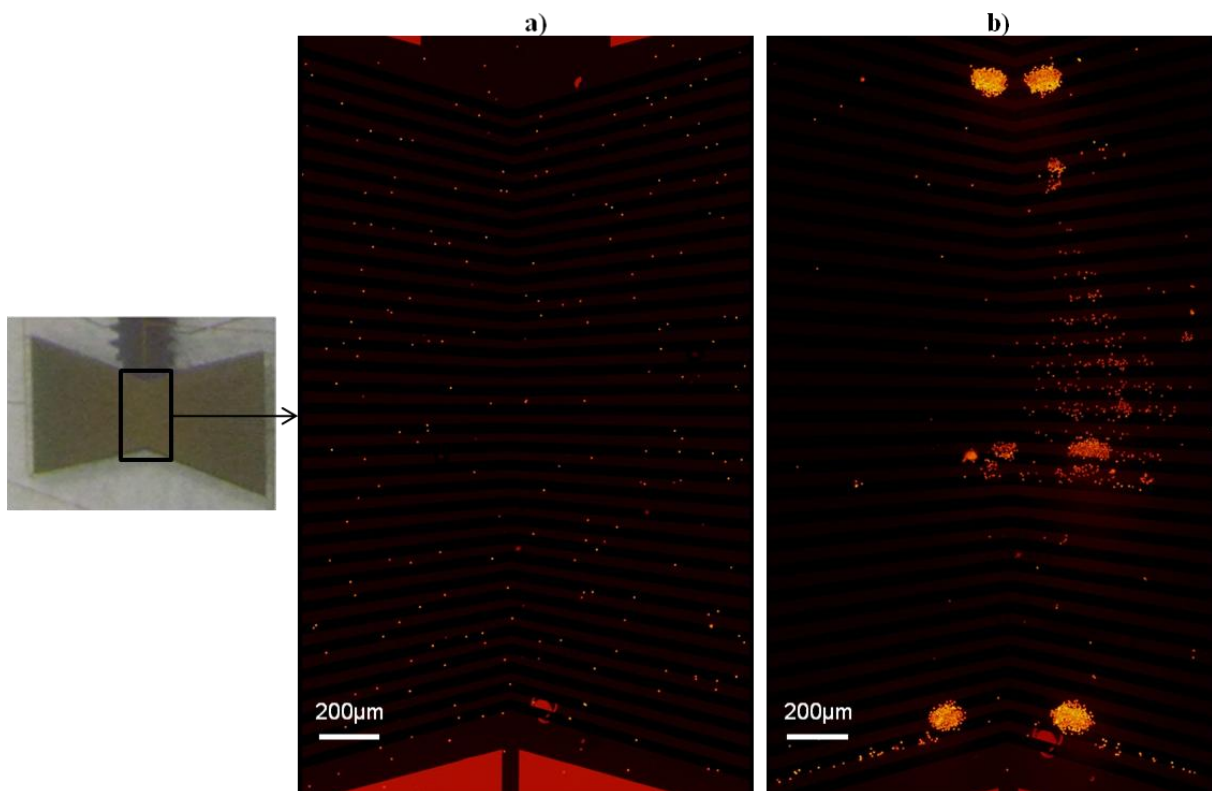


Figure 4.20 : a) Photographie (vue de dessus) d'un concentrateur. Répartition initiale des oocystes de *Cryptosporidium parvum* ; b) répartition finale après application d'un signal électrique (tension sinusoïdale $V=30V$, $f=300kHz$). Les oocystes sont marqués en rouge (Crypt-a-Glo, A400Cy3, Waterborne Inc, New Orleans, USA). La concentration de l'échantillon est de 400 oocystes/ μL .

La figure 4.20 montre un exemple d'images obtenues avant (a) et après (b) application du champ électrique. Initialement, les oocystes sont répartis de façon homogène dans le réservoir. A la fin du processus de concentration, les oocystes sont rassemblés dans la zone centrale du réservoir, avec une forte concentration sur les bords. Au contraire les oocystes sont très peu présents dans les zones périphériques (figure 4.21).

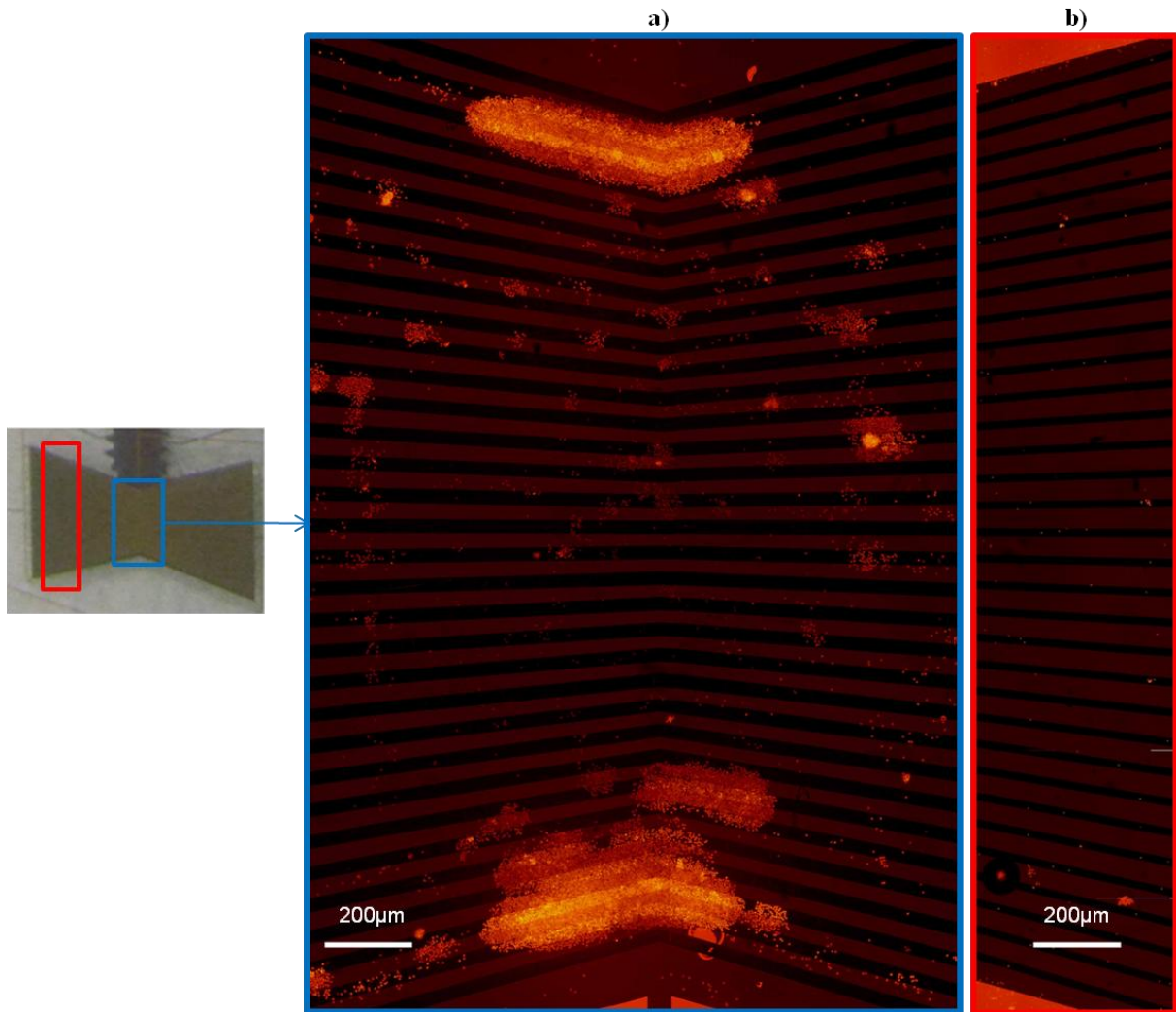


Figure 4.21 : a) Photographie (vue de dessus) d'un concentrateur. Rassemblement des oocystes dans la zone centrale et sur les bords du système d'électrodes ; b) la zone périphérique contient très peu d'oocystes après l'étape de concentration. La tension appliquée est de 30V, la fréquence est de 300kHz. La concentration de l'échantillon employé est de 1 000 oocystes/ μ L.

Pour plus de précision, la concentration initiale en oocystes est calculée à partir du décompte établi sur des clichés pris avant l'application du champ électrique, afin d'éviter les erreurs dues au pipetage de la solution et au dépôt de la goutte d'échantillon. La surface réelle de la zone étudiée est calculée grâce au nombre de pixels composant l'image. Le volume est déduit directement à partir de la surface connue du réservoir complet.

La valeur de la concentration initiale exploitée dans les graphiques est une moyenne calculée sur trois décomptes établis à partir de trois clichés différents sur le même échantillon.

La concentration finale est calculée de la même façon, à partir de la mesure de la surface utilisée pour le décompte. La surface de comptage est variable d'une expérience à l'autre. Le volume équivalent varie entre 270nl et 360nl. Le taux de récupération est le rapport entre le nombre de particules présentes initialement dans la totalité du réservoir et le nombre de particules comptées dans la zone finale de concentration.

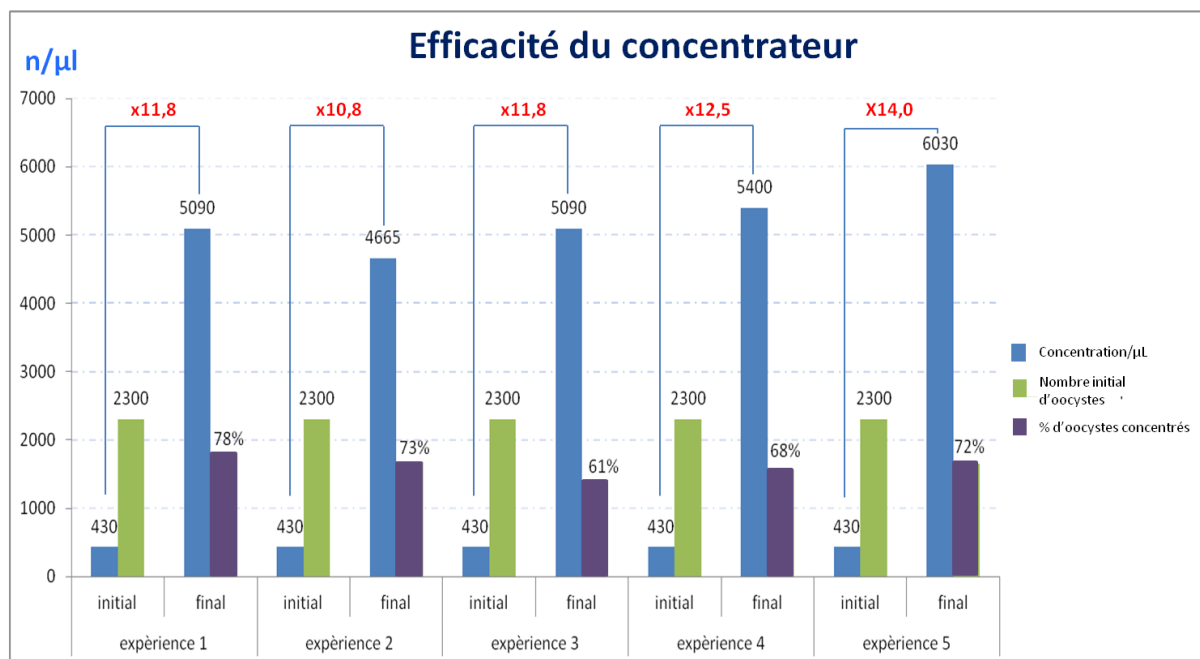


Figure 4.22 : Résultats des expériences de concentration sur les larges puits en éventail. Le taux de récupération moyen est de 70%.

Les résultats de cinq expériences de concentration sont présentés figure 4.22. Plus de 70% des oocystes initialement présents sont rassemblés dans une zone restreinte équivalente à un volume moyen de 300nL. La concentration moyenne équivalente est multipliée par 12, passant d'une valeur moyenne initiale de 430 oocystes/ μL à une valeur moyenne finale de 5200 oocystes/ μL . Cette valeur de concentration est tout de même surestimée du fait que tous les oocystes présents dans cette zone ne peuvent être extraits dans un volume si petit. Elle représente le pouvoir concentrateur du système de rassemblement de particules, avant la phase d'extraction par création de goutte. En considérant que le volume final (correspondant à la goutte extraite lors de l'étape de création de goutte) est de 800nL, la concentration est de l'ordre de 2000 oocystes/ μl , ce qui correspond à une multiplication de la concentration par 4,5.

4.3.4.2 Discussion

La procédure de détection des parasites de *C. parvum* employée à l'heure actuelle est schématisée à la figure 4.23. Cette méthode repose sur des prélèvements volumineux d'échantillons allant de 10 à 50 litres (figure 4.23.A). Après une filtration macroscopique (figure 4.23.B), l'échantillon est concentré dans des volumes de 0,5mL à partir d'échantillons de 5mL grâce à la technique de séparation immuno-magnétique (figure 4.23.C). Les billes magnétiques sont détachées des oocystes (figure 4.23.D), puis les oocystes sont marqués grâce à un marqueur fluorescent (figure 4.23.E), puis comptés manuellement ou automatiquement (figure 4.23.F-G).

La question est de savoir si notre système est capable de remplacer l'étape de concentration de la méthode standard décrite ci-dessus. Dans le cadre d'un contrôle en sortie de station d'épuration ou lors de prélèvements environnementaux dans des conditions ordinaires, les concentrations en oocystes sont très faibles (moins de 1 oocyste/L). Dans ces conditions, un prélèvement de 50 litres contiendrait au maximum 50 parasites. Dans l'état actuel de nos recherches, le concentrateur ici-développé ne permet pas de concentrer une quantité aussi faible de parasites.

Cependant, notre outil peut s'avérer efficace en cas d'évènements incontrôlés tels qu'une inondation, sources de contaminations très importantes des eaux de surfaces. De plus, nous pourrions imaginer l'emploi du concentrateur dans un système de microfluidique continue, plus adapté à la manipulation de volumes de l'ordre du millilitre. Par exemple, le concentrateur pourrait être insérer dans le fond d'un canal microfluidique, au niveau d'une intersection perpendiculaire, afin que la zone de rassemblement soit à proximité d'un canal permettant de pomper l'échantillon rassemblé.

Enfin, le concentrateur peut être intéressant dans le cadre de la mesure du pouvoir infectieux, dont la technique actuelle la plus efficace est l'infection de souriceaux ou de souris adultes immunodéprimées. En effet, le nombre de parasites inoculés peut être de l'ordre de 100 à 1 000 oocystes/ μL . Il peut être intéressant de gagner un ordre de grandeur dans la concentration de l'échantillon.

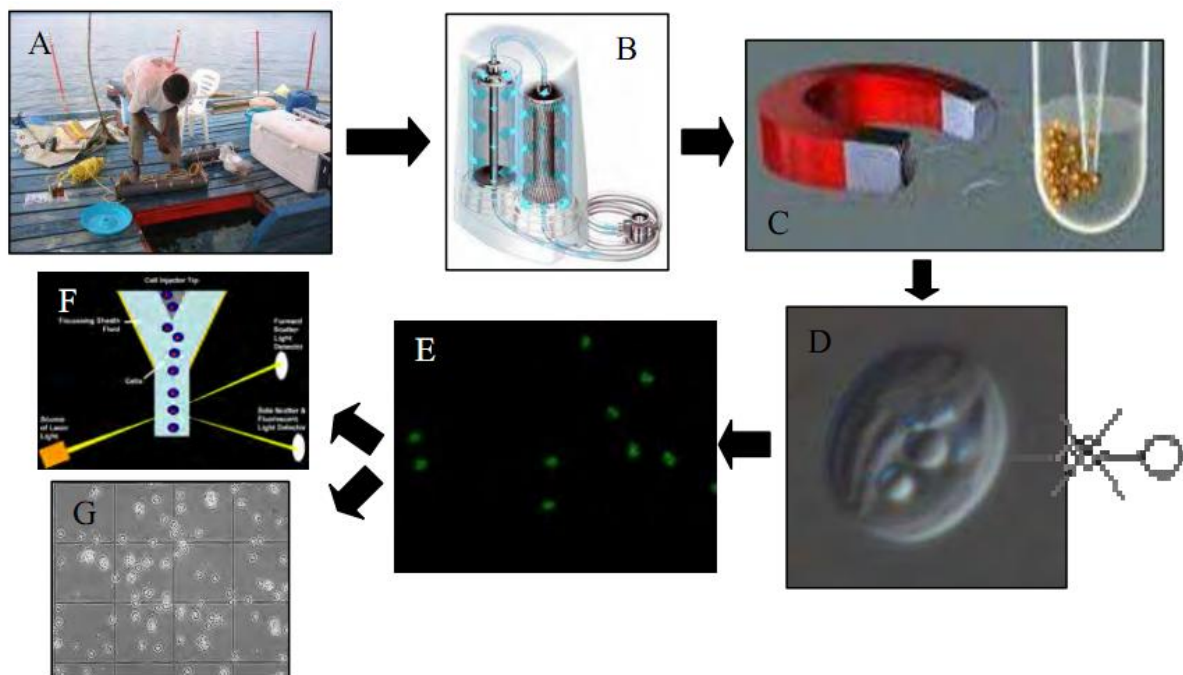


Figure 4.23 : Schéma de la procédure actuelle de détection des parasites *C. parvum* ; A : Échantillonnage ; B : Filtration ; C : Séparation immuno-magnétique ; D : Séparation des billes aux parasites ; E : Marquage par fluorescence et DAPI ; F : Comptage automatique par cytométrie en flux ; G : Comptage manuel avec cellule de Malassez. [Houssin, 2011].

A l'heure actuelle, le système peut être optimisé davantage, notamment au niveau du choix du matériau hydrophobe. Nous avons observé que la couche de Cytos[®] perturbe le bon fonctionnement du concentrateur. Nous avons constaté qu'un système neuf, ayant une couche hydrophobe intacte, ne possède pas de pouvoir concentrateur. Le phénomène de concentration est détruit par l'apparition du phénomène d'électro-osmose. Ce phénomène s'observe par la répartition des particules le long des bords des électrodes alors que le régime de diélectrophorèse est négatif (figure 4.24). Selon la dégradation du matériau de cette couche, l'effet électro-osmotique disparaît, et le pouvoir concentrateur du système augmente. A ce jour, l'explication de ce phénomène n'est pas connue. Néanmoins nous pouvons émettre l'hypothèse que le caractère hydrophobe et/ou diélectrique de la surface entraîne l'apparition de charges à l'interface liquide/solide. Ces charges sont mises en mouvements par le champ électrique et le phénomène d'électro-osmose est généré.

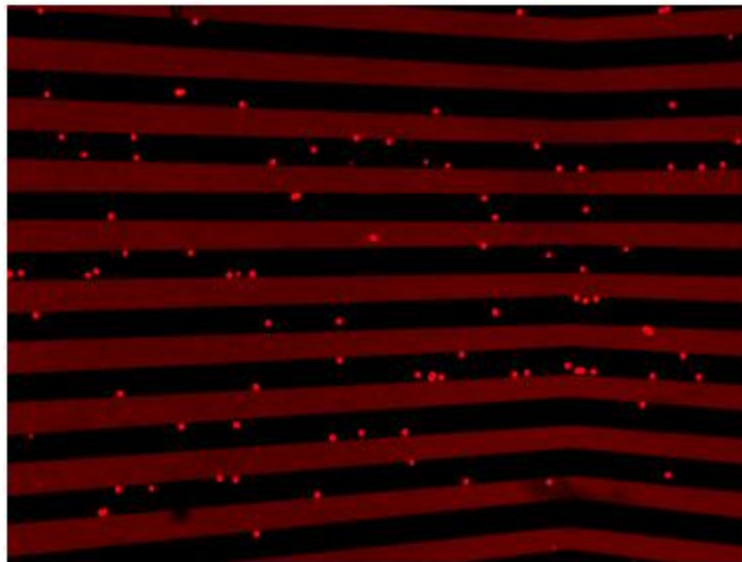
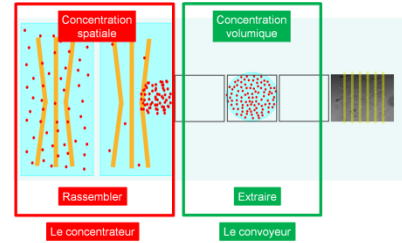


Figure 4.24 : Photographie d'un résultat d'expérience où la répartition des oocytes est homogène, le long des bords des électrodes.

Nous supposons que la disparition de l'électro-osmose est liée à la dégradation du matériau recouvrant les électrodes. Cependant, nous ne savons pas qui, du caractère diélectrique ou du caractère hydrophobe, est impliqué dans ce processus. Ces observations nécessiteraient une étude approfondie, avec par exemple le test d'autres matériaux hydrophobes.

4.4 L'extracteur



4.4.1 Objectifs

L'objectif principal est de valider le concept de concentration et d'extraction des oocystes par création de goutte au sein d'un système EWOD. Après l'étape de concentration, les oocystes de *Cryptosporidium parvum* rassemblés sur le bord du réservoir sont extraits dans une goutte plus petite, créée par électromouillage. Le nombre d'oocystes récoltés est directement obtenu par décompte manuel à l'aide des photos prises au microscope.

4.4.2 Présentation du banc de test

La partie électrique du banc de test est identique à celle des deux expérimentations précédentes (section 1.2). Le protocole d'observation est différent parce que le substrat de verre possédant les électrodes du concentrateur et du convoyeur est recouvert par le capot super hydrophobe (figure 4.26). Auparavant, nous avons employé des puits en SU8 puis des cales en silicium pour encapsuler la goutte. Pour réaliser l'extraction des oocystes, nous employons un capot superhydrophobe car il garanti une hystérésis nulle et favorise donc le convoyage par électromouillage (cf. chapitre 2, section 1.3). Ce capot est opaque, ce qui nécessite une observation de la phase d'extraction par création de goutte par le dessous. Pour cela, le dispositif est placé sur un portoir qui permet l'observation par le dessous à l'aide d'une caméra (Hamamatsu Orca Flash 2.8, Japon) (figure 4.27).

Grâce à une interface LabView (figure 4.25), les électrodes sont activées et désactivées séquentiellement selon un chemin préalablement établi par l'utilisateur. Il est possible de régler le temps de commutation entre chaque séquence. Des séquences complexes (par exemple : la création d'une goutte) peuvent être enregistrées dans un fichier.

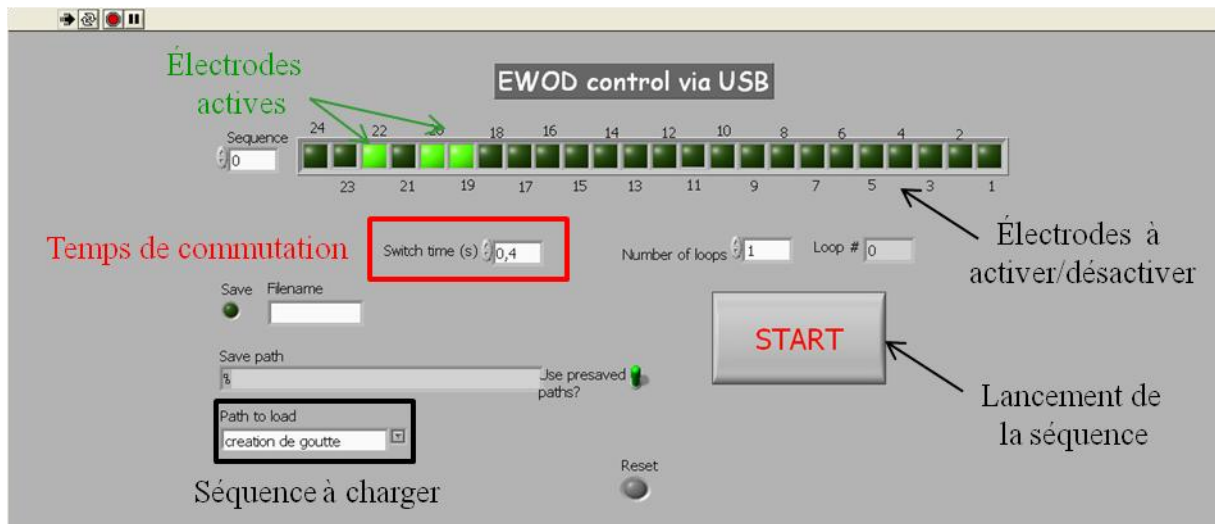


Figure 4.25 : capture d'écran de l'interface de contrôle des électrodes (LabView).

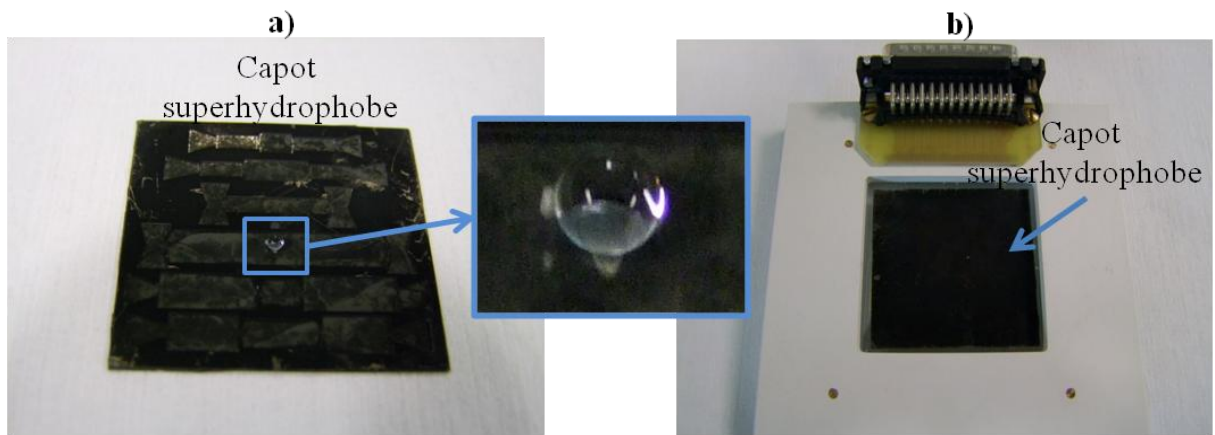


Figure 4.26 : Photographies du dispositif : a) capot super hydrophobe (dans l'insert : goutte d'eau) ; b) capot super hydrophobe sur le dispositif pour la création de goutte par EWOD.

Après l'extraction des particules dans la goutte créée par électromouillage, l'échantillon créé est observé par microscopie à épifluorescence après retrait du capot et évaporation du liquide. Chaque image de la goutte créée est reconstruite à partir des clichés obtenus avec le microscope afin d'avoir une image globale de la zone où il faut compter le nombre d'oocystes. Les étapes de micro-fabrication du capot super hydrophobe sont présentées dans la section suivante.



Figure 4.27 : Photographies du banc d'observation comprenant une caméra placée en dessous du porte support pour l'observation de l'étape de création de goutte. La goutte créée est ensuite observée par microscopie à épifluorescence.

4.4.3 Micro-fabrication du capot super hydrophobe

L'étape d'extraction de goutte est facilitée par l'emploi d'un capot super hydrophobe. En effet, l'hystérésis de ce type de surface est extrêmement faible, voire nulle, ce qui diminue les forces de frottement de la goutte sur la surface. Le capot super hydrophobe est une surface en silicium sur laquelle sont gravés des nanofils. Ces nanofils sont recouverts d'un fluoropolymère hydrophobe. La rugosité de la surface confère au système un caractère super hydrophobe.

Le réservoir du concentrateur peut directement être usiné dans le capot par gravure profonde, ce qui permet de s'affranchir de l'emploi de cales pour garantir une hauteur de goutte de 200 μm (figure 4.28).

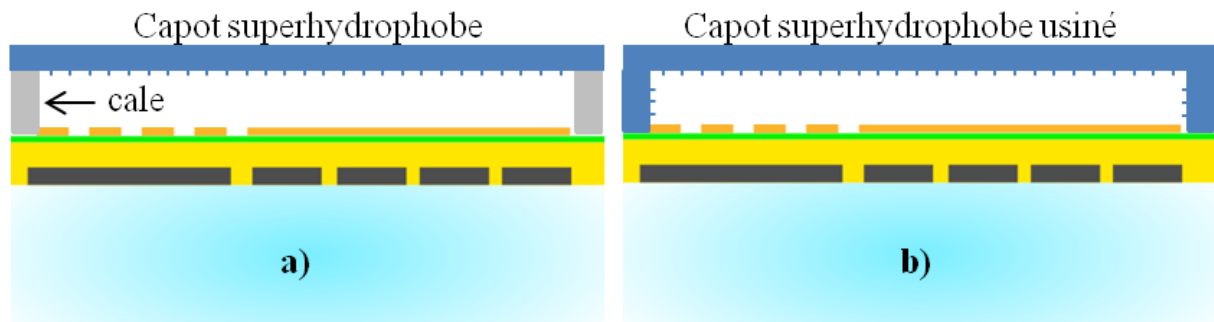


Figure 4.28 : a) Dispositif avec cale. b) Dispositif avec capot usiné.

4.4.3.1 Etapes de fabrication du capot

Les structures de réservoirs sont gravées par gravure profonde ICP. Pour cela, un masque en aluminium et en résine (AZnLof 2070) est dessiné par photolithographie optique (figure 4.29.a-c). Le développeur utilisé (AZMIF 326) permet, en plus de l'élimination de la résine non insolée, la suppression du métal non protégé par la résine. Après gravure de 200 μm de profondeur du silicium (figure 4.29.d), la résine puis l'aluminium sont retirés grâce au développeur (figure 4.29.e-f).

L'étape suivante consiste à découper le substrat de silicium aux dimensions du support du dispositif de concentration et d'extraction. Les nanofils sont gravés sur la surface par voie chimique (figure 4.29.g, voir paragraphe 3.3.2). A la fin de ce procédé, une couche mono moléculaire d'OTS (Octadécyltrichlorosilane) est déposée par voie liquide (figure 4.29.h). Ce mécanisme a lieu sous boîte à gants, ce qui permet d'avoir une atmosphère anhydre et ainsi évite la polymérisation du composé. L'angle de contact d'une goutte d'eau sur ces surfaces super hydrophobes varie entre 140° et 160°. L'hystérésis est nulle, et une goutte déposée sur ce type de surface roule à la moindre inclinaison (effet 'rolling ball'). Le capot ainsi réalisé est déposé sur le substrat de verre comprenant le concentrateur et les électrodes de convoyage par EWOD (figure 4.29.i).

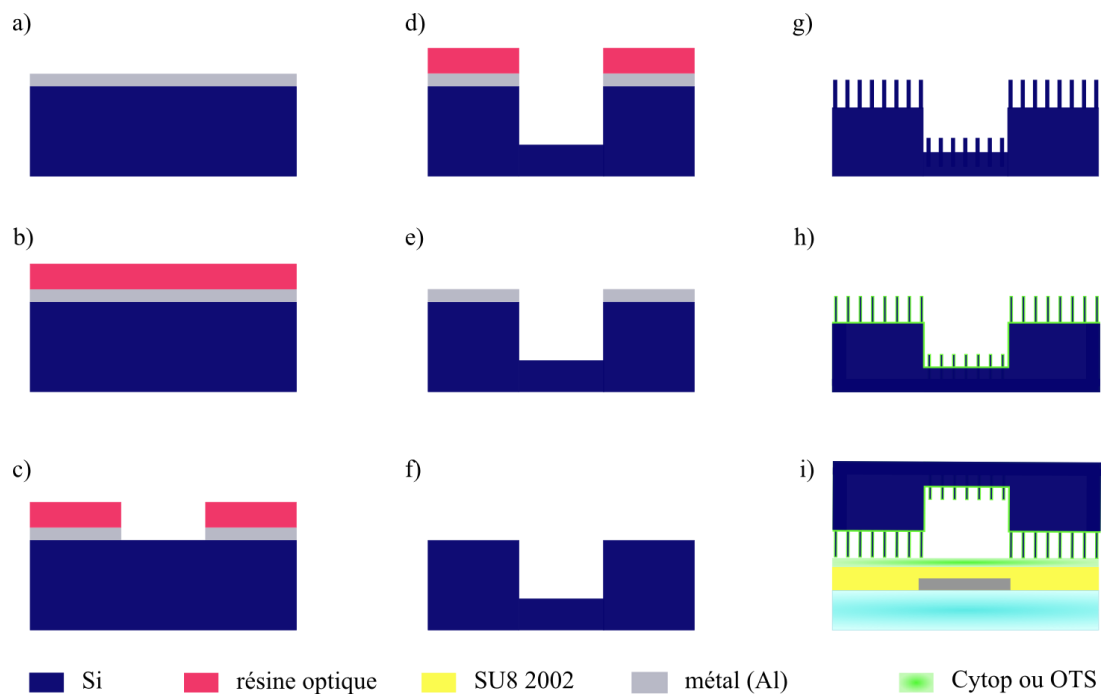


Figure 4.29 : Etapes du procédé de fabrication d'une surface superhydrophobe nanostructurée.

4.4.3.2 Gravure des nanofils par voie chimique

Les nanofils sont produits par gravure chimique du silicium [Piret, 2010]. Le mécanisme de réaction est présenté figure 4.30.

Le substrat de silicium est plongé dans une solution de nitrate d'argent et d'acide fluorhydrique (HF). Une réduction des ions argent et une oxydation du silicium ont lieu à la surface de contact substrat/liquide (figure 4.30.a). Les électrons de la bande de valence du silicium sont captés par les ions Ag^+ . Des nanoparticules d'argent se forment à la surface. L'oxydation du silicium produit une couche de SiO_2 sous les nanoparticules d'argent. L'électronégativité de l'argent étant plus forte que celle du silicium, les ions argent sont préférentiellement attirés par les nanoparticules. Ce mécanisme induit une oxydation excessive du silicium (figure 4.30.b). L'oxyde de silicium est gravé par le HF (figure 4.30.c) et les nanoparticules tombent dans le trou ainsi formé. Le processus est entretenu par l'apport d'ion argent en excès. Après quelques minutes, les nanofils se forment sur la surface (figure 4.30.d).

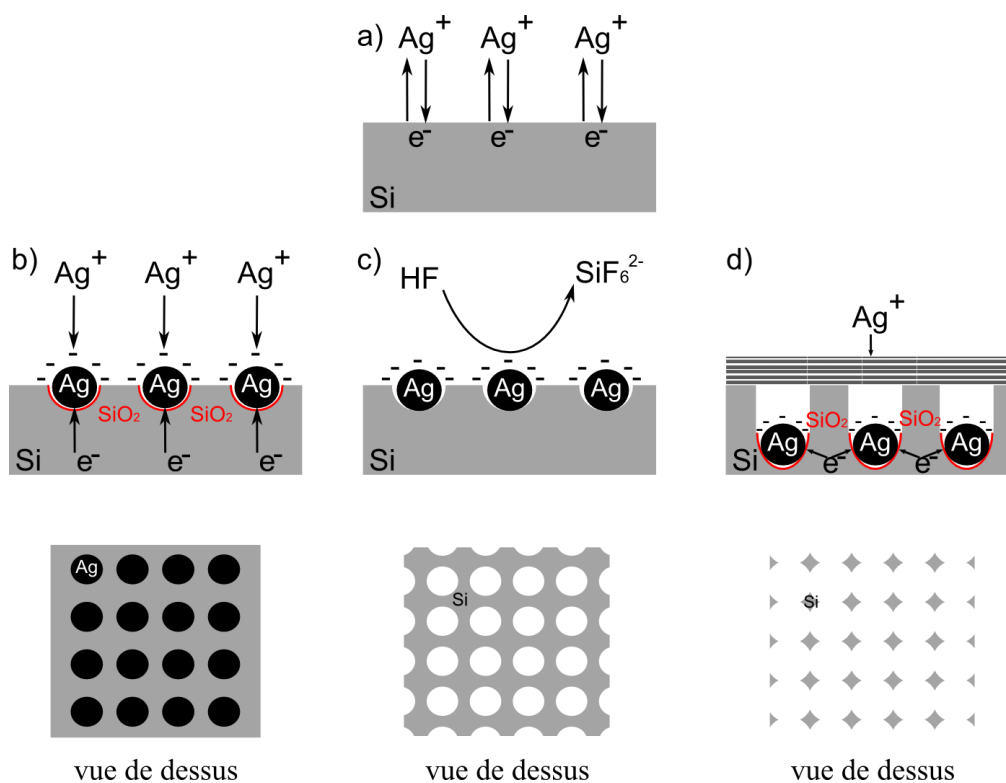


Figure 4.30 : Procédé chimique de la croissance de nanofils de silicium. a) Réduction des ions argent et oxydation du silicium au niveau de la surface de contact ; b) formation d'oxyde de silicium et de nanoparticules d'argent ; c) gravure de l'oxyde de silicium par l'acide fluorhydrique ; d) le processus est entretenu par l'apport d'ions argent en excès.

En pratique, le substrat de silicium est plongé dans un mélange de HF dilué à 20% et de AgNO_3 (concentration de 0,04 M). Le mélange est préalablement chauffé à 50°C grâce à un bain-marie. Pour obtenir une structure de nanofils convenable qui confèrera à la surface son caractère superhydrophobe ; le temps de réaction est de 9 minutes. Enfin, le dépôt d'argent résiduel en surface est éliminé dans une solution, mélange de H_2O , HCl et HNO_3 en proportion égale. Cette étape prend 12 heures.

4.4.4 Observations et discussion

4.4.4.1 Observations

Une goutte d'un volume compris entre 5 et 7 μ L de liquide contenant des oocystes est déposée sur le dispositif. Ce volume correspond à la capacité du réservoir définie par sa profondeur (200 μ m) et la surface du concentrateur. Le capot super hydrophobe est déposé sur le système. Dans le cas du capot super hydrophobe usiné, l'alignement se fait à la main en visualisant la goutte grâce à la caméra. Dans le cas d'une surface super hydrophobe plane, elle est directement déposée sur les cales en silicium placées sur le substrat de verre.

Suite à l'étape de rassemblement des particules, la procédure de création de goutte est exécutée à l'aide du logiciel LabView. La séquence est démarrée après avoir réglé les paramètres du générateur de fonction comme suit :

- Tension : 8 à 10V (correspond à 100-125V en sortie de l'amplificateur)
- Fréquence : 1kHz
- Signal carré
- Temps de basculement d'une électrode à la suivante : 0,3s à 1s.

L'étape de création de goutte est décomposée figure 4.31. Le volume de la goutte en sortie est de 800nL, pour un volume de départ de 6 μ L (capacité du réservoir).

L'étape d'extraction n'a pas été validée pour les réseaux d'électrodes de type losange et éventail. Seul le réseau en éventail symétrique associé à des électrodes EWOD de 2mm de côté permet de procéder à la création de goutte et l'extraction de l'échantillon.

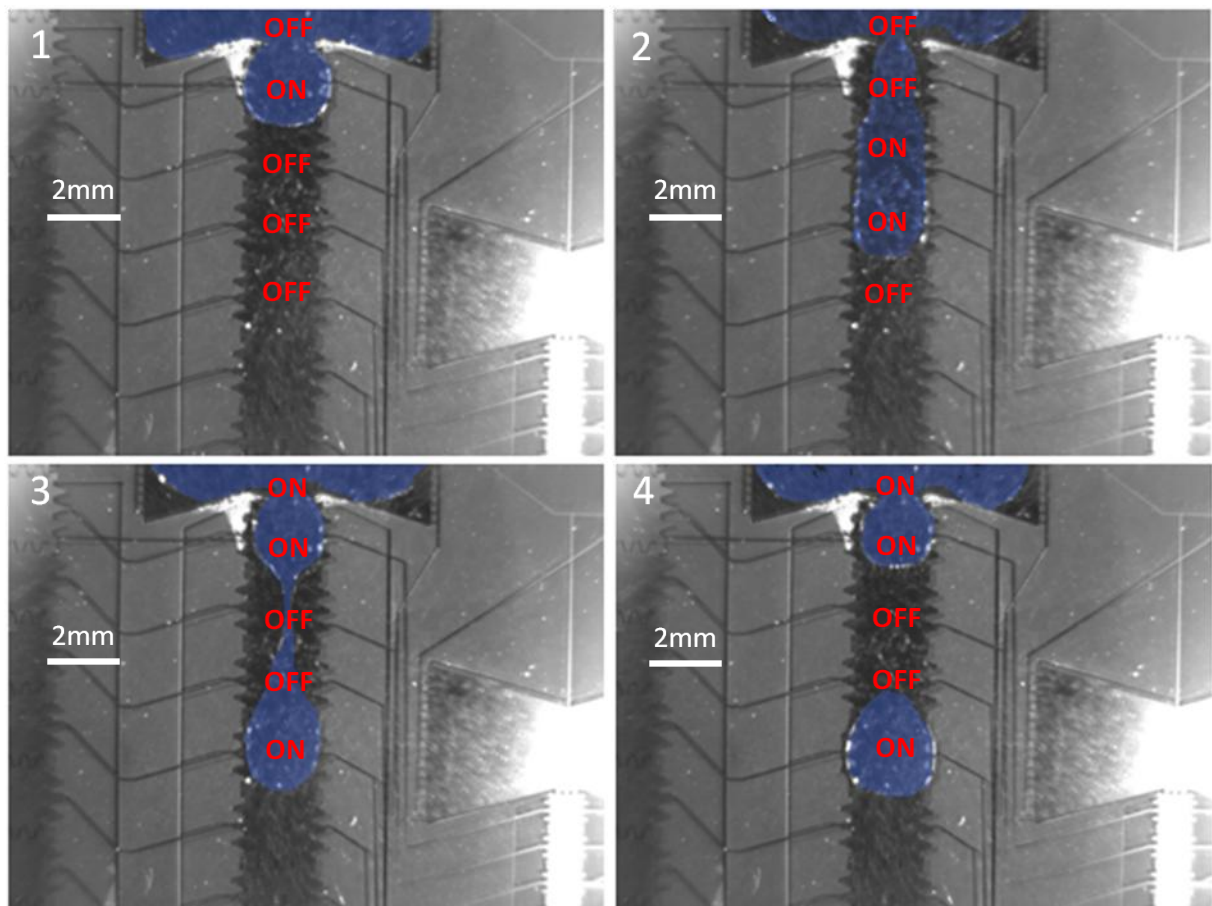


Figure 4.31 : Séquence de création de goutte par électromouillage. 1) extraction du doigt de liquide à partir du réservoir, 2) création du doigt de liquide hors du réservoir, 3) pincement du doigt de liquide par activation des électrodes du réservoir, 4) coupure du doigt de liquide et création de la goutte hors du réservoir.

A la fin du processus de création de goutte, le capot est enlevé afin de laisser le liquide s'évaporer. Pour une meilleure observation au microscope, une petite quantité d'eau désionisée est placée sur la zone sèche afin de dissoudre les sels cristallisés, puis est recouverte par une lame couvre objet.

Deux expériences de concentration-extraction sont rapportées ci-dessous. Le meilleur résultat obtenu est illustré figure 4.33. La goutte extraite du réservoir possède un volume de 800nL, ce qui équivaut à une concentration de 1000 oocystes/ μ L. Le système a donc multiplié la concentration en oocystes par 4. Cependant, ce résultat optimal n'est pas toujours reproductible. La concentration moyennée sur quatre expériences de concentration-extraction n'est que 2,4 fois plus importante que la concentration initiale.

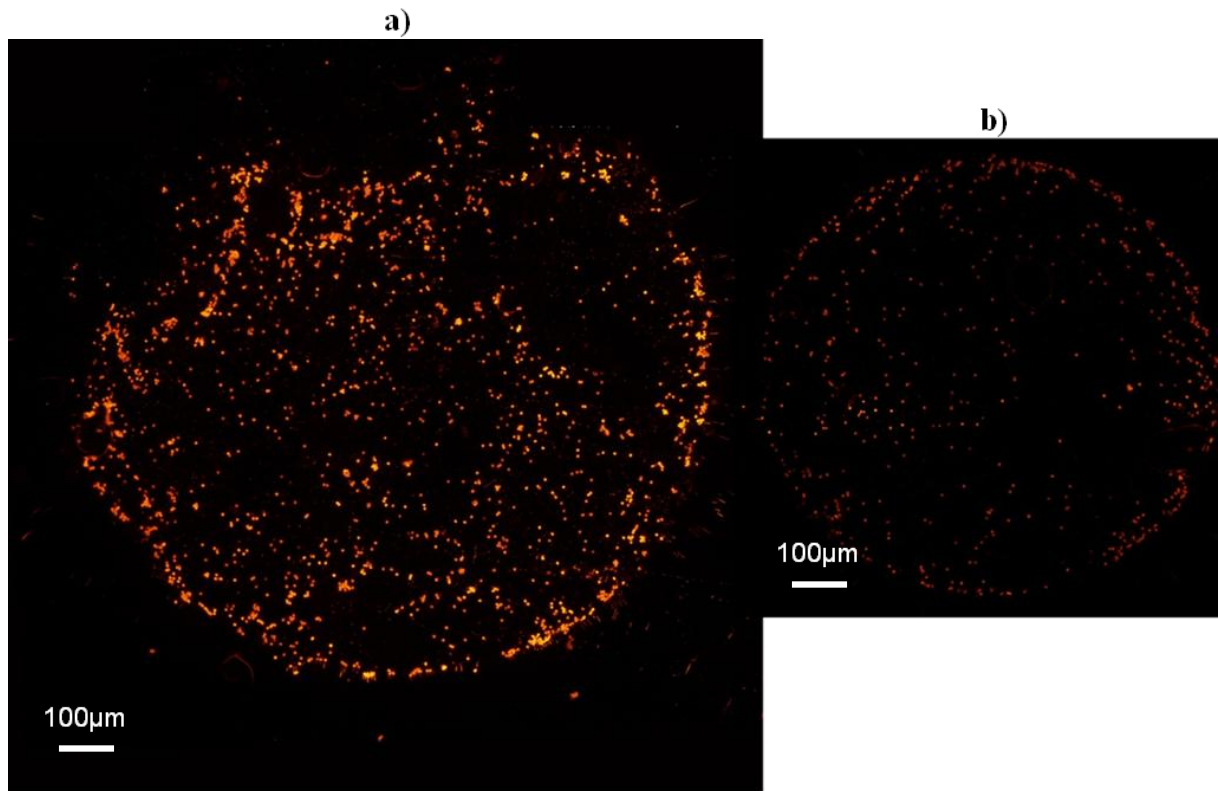


Figure 4.32 : Photographie des gouttes séchées a) dans le réservoir (1500 oocystes comptés). b) sur l'extracteur (450 oocystes comptés).

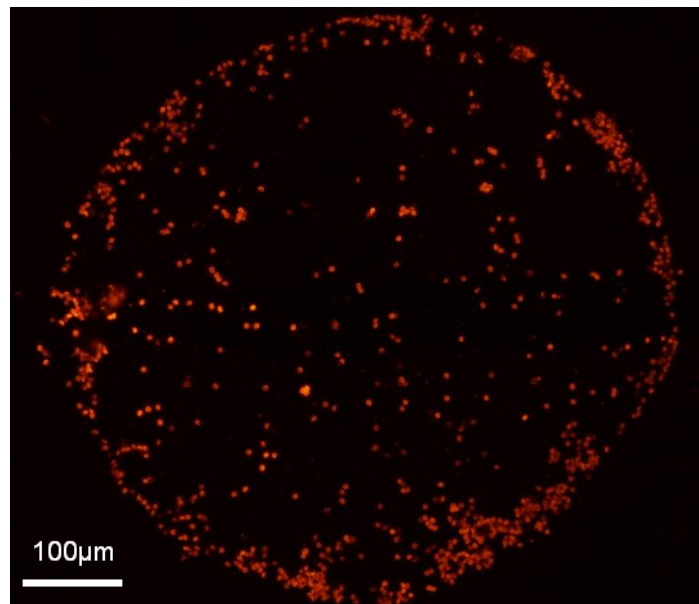


Figure 4.33 : Photographie de la goutte créée après l'étape de concentration. Environ 800 oocystes ont été extraits du réservoir dans une goutte de 800nL, ce qui équivaut à une concentration finale de 1000 oocystes/ μ L.

4.4.4.2 Discussion

Le concept d'un dispositif « concentrateur-extracteur » utilisant la technologie d'électromouillage a été montré. La concentration finale en parasites est en moyenne multipliée par 2,4. Ce résultat est aussi bon que celui exposé dans la littérature (travaux de Fan et al.) où le pouvoir concentrateur est de 1,6 [Fan et al., 2008].

Cependant, la reproductibilité des expériences n'est pas acquise et il est nécessaire de travailler sur cet aspect.

Le premier problème limitant la reproductibilité de l'étape de création de goutte est le parallélisme entre les deux plans encapsulant la goutte (figure 4.34). En effet, lorsque les plans ne sont pas parallèles, la goutte est pincée dans le réservoir et celui-ci ne se vide pas de manière symétrique. Le doigt de liquide ne peut pas se créer sur plus de deux électrodes. La création de goutte est alors impossible.

Ce problème est en partie résolu par l'utilisation d'un support en plastique rigide ne se déformant pas sous la pression mécanique des vis de serrage. Mais, les nombreuses manipulations manuelles nécessaires à la mise en place du capot super hydrophobe limitent la durée de vie des surfaces à cause de l'usure mécanique due aux frottements lors de l'alignement. Une optimisation du support du dispositif est nécessaire afin de pouvoir produire efficacement la création de goutte de manière répétée.

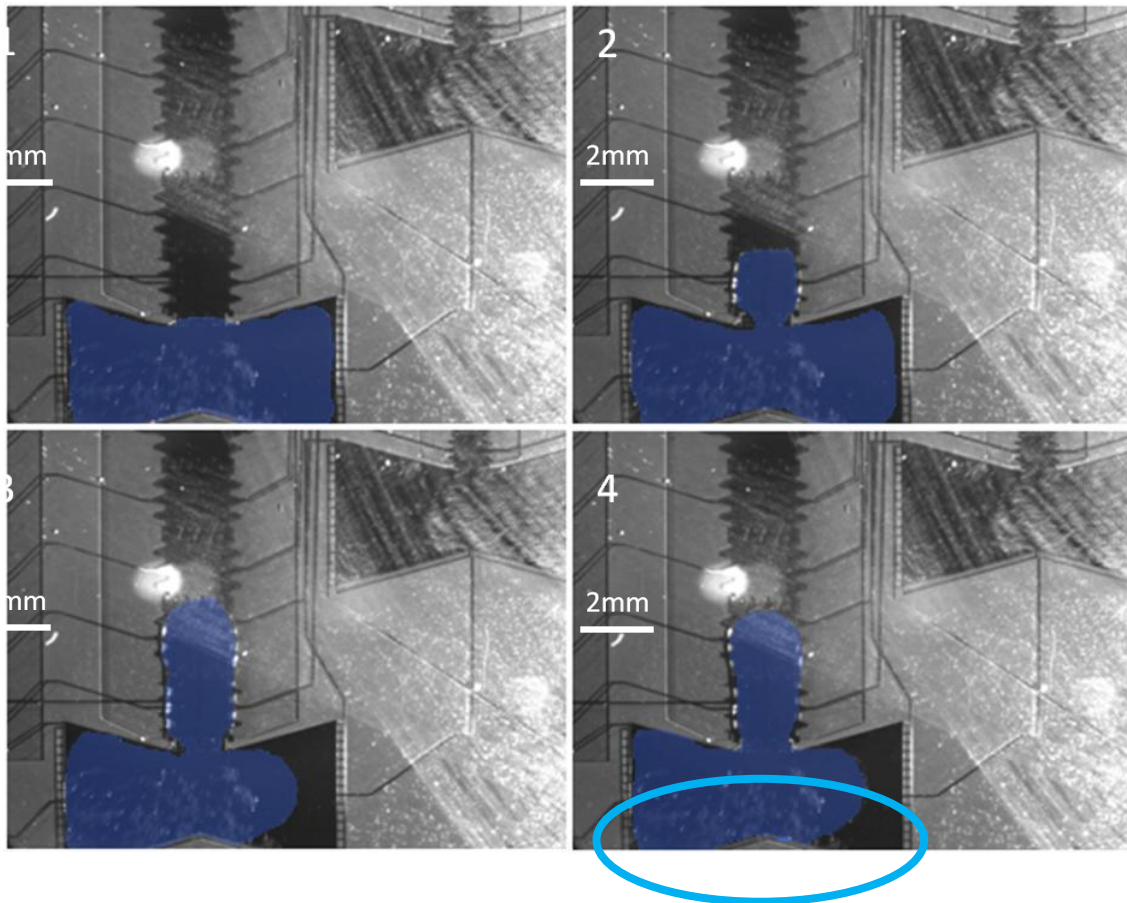


Figure 4.34 : Etapes de création de goutte dans un cas non favorable. 1) le liquide est dans le réservoir. 2) la première électrode est activée. 3) la deuxième électrode de déplacement est activée. 4) la troisième électrode est activée, mais le liquide ne peut se déplacer ; le réservoir est vidé de façon dissymétrique, ce qui laisse supposer que les deux plans encapsulant la goutte ne sont pas parallèles.

Les figures Figure 4.35 et Figure 4.36 montrent la détérioration de l'état de surface du dispositif. La couche diélectrique et les électrodes en métal peuvent être endommagées de façon irréversible. Il est observé l'apparition de bulles dans la goutte, rapidement suivie par la destruction du système d'électrodes. Dans une moindre mesure, il existe une dégradation rapide de l'état de la surface hydrophobe. L'hystérésis de la surface augmente et la goutte accroche sur la surface, ce qui la rend de plus en plus difficile à déplacer. Cette détérioration est principalement liée à la qualité du matériau diélectrique utilisé. Lorsque le caractère isolant de la surface disparaît, les fortes tensions appliquées sont reportées dans le liquide et détruisent la surface du dispositif. Ce problème peut être surmonté par l'utilisation d'un autre matériau diélectrique tel que le parylène, qui semble être plus robuste [Gong & Kim, 2008].

Le test avec ce matériau n'a pu être mené à bien à cause de problèmes d'ordre technologique (système non utilisable à cause de coupures des lignes de connexion) qui n'ont pu être résolus de manière efficace du fait de l'absence d'équipement de dépôt de ce type de matériau dans le laboratoire.

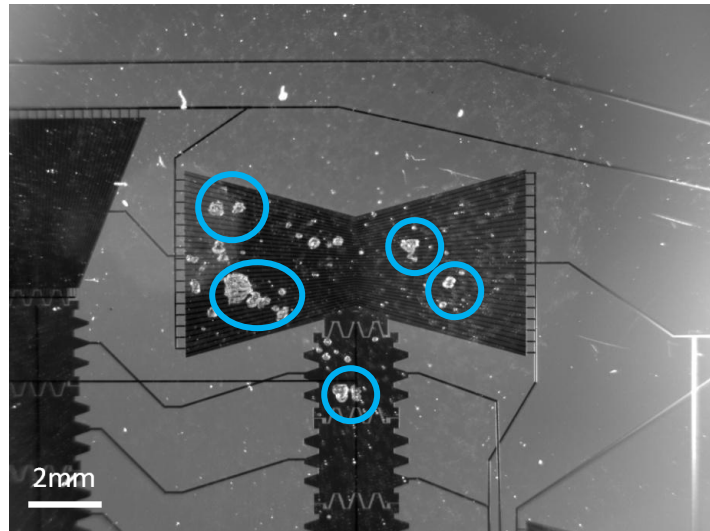


Figure 4.35 : Photographie du dispositif montrant une détérioration de la couche diélectrique (SU8) et induisant un phénomène d'électrolyse.

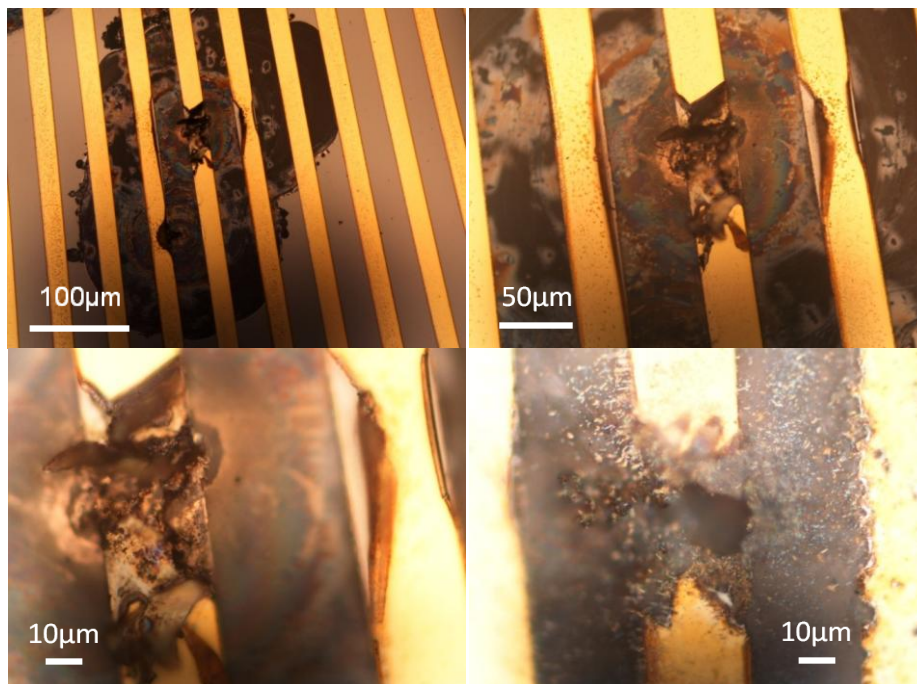
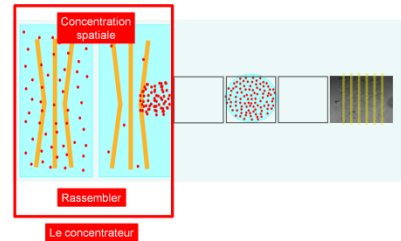


Figure 4.36 : Photographie du dispositif montrant une détérioration de la couche diélectrique (SU8) et des électrodes en or.

4.5 Le séparateur



4.5.1 Intérêt de séparer des espèces en biologie

La problématique du poly-parasitisme est la motivation première justifiant l'intérêt de ce type d'expérience. En effet, il s'avère que, dans de nombreux cas d'infection parasitaire, l'hôte est infesté, non par un mais plusieurs parasites [Thompson & Smith, 2011]. A l'heure actuelle, alors que les protozoaires ne devraient plus être considérés de façon isolée pour l'étude de leur impact sur la santé, il existe peu d'outils mis en œuvre pour améliorer les techniques d'extraction et de séparation des agents pathogènes en situation de co-infestations. Cette problématique est développée plus en détail dans la première partie de l'annexe A.

Les échantillons issus de prélèvements dans l'environnement ne présentent que très rarement une contamination mono parasitaire. Les genres *Cryptosporidium spp.* et *Giardia spp.* sont communément retrouvés ensemble. La distinction de ces groupes parasitaires par un dispositif de type laboratoire sur puce visant à analyser séparément leur présence ou leurs effets serait un atout majeur.

Enfin, il existe à ce jour peu d'outils de routine pour discriminer les oocystes issus de différentes espèces de *Cryptosporidium*. La taille, l'espèce de l'hôte, l'aptitude à infecter certains types cellulaires ou certains animaux de laboratoire, les profils génétiques et antigéniques (différentiation par le profil antigénique : [Sturbaum et al., 2008]) sont des critères de distinction des espèces de *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium parvum* sont les deux espèces infectant majoritairement l'homme. Cependant, ils ne présentent pas de différences morphologiques. Par conséquent, la différenciation de ces deux espèces par une méthode électrique serait (si elle est possible) un atout majeur pour la compréhension du rôle respectif de chacune dans le développement de certaines Cryptosporidioses humaines.

4.5.2 Objectifs

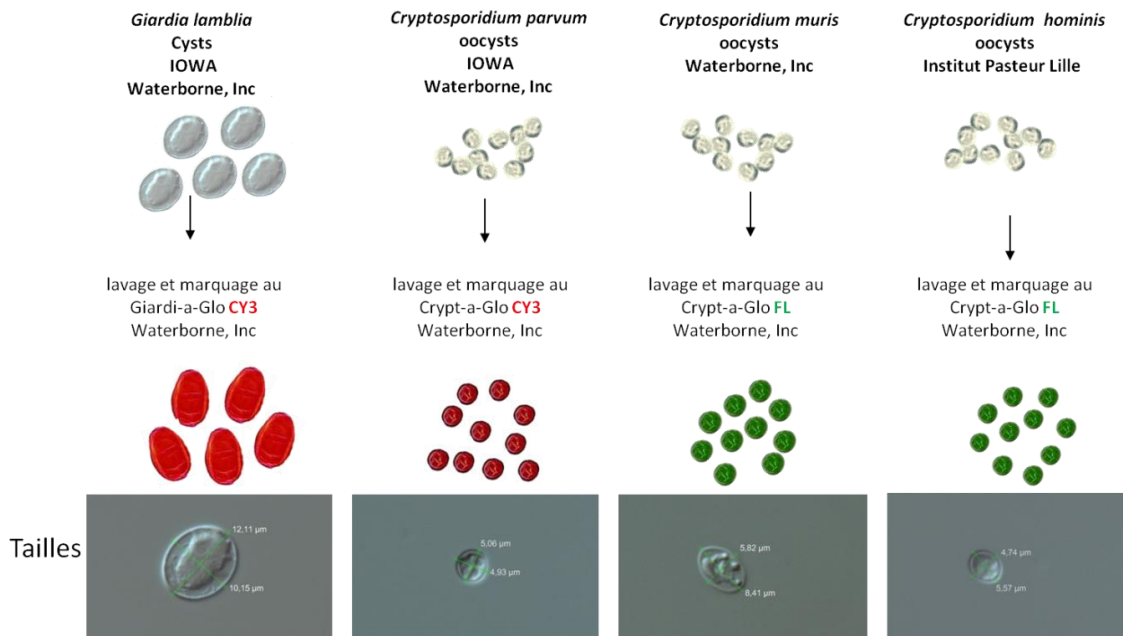


Figure 4.37 : Origines, types de marquages et différences de tailles et de formes des quatre espèces de parasites étudiés (*Giardia Lambia* : forme ovale, 13µm*7-9µm, *Cryptosporidium parvum* : forme circulaire, 4-6µm de diamètre, *Cryptosporidium muris* : forme ovale, 7.5-9.8*5.5-7µm, *Cryptosporidium hominis* : forme circulaire, 4-6µm de diamètre).

L'objectif est de séparer deux genres ou espèces différentes de manière électrique grâce à la diélectrophorèse. La sélectivité est basée sur la différence de taille des deux entités à séparer. La figure 4.37 expose les différences de morphologie et de taille des quatre parasites employés lors des tests. Nous rappelons que la force diélectrophorétique (équation (3.1), chapitre 3) varie avec le cube du rayon. Par conséquent, la différence de taille engendre une réponse diélectrophorétique différente, ce qui permet de pouvoir induire une réponse positive pour l'un et négative pour l'autre en choisissant judicieusement la fréquence de travail. Deux genres de tailles très différentes sont utilisés dans le test de séparation (*Cryptosporidium* et *Giardia*), puis deux espèces dont la taille et la forme diffèrent de quelques microns (*C. parvum* et *C. muris*), et enfin deux espèces très similaires en taille (*C. parvum* et *C. hominis*). Dans ce dernier cas, le but est de savoir si une différence génotypique peut être détectée électriquement par une différence de comportement diélectrophorétique (caractère phénotypique).

4.5.3 Dispositifs et méthodes

Le système et le banc de test employés sont les mêmes que ceux de la section 2 de ce chapitre. Le concentrateur en éventail symétrique de la partie 2 est utilisé en mode séparateur. La hauteur du réservoir est garantie par les cales de silicium selon le même mode opératoire que la partie 2. La préparation des échantillons est identique à celle décrite dans la section 2.3. Chaque échantillon de parasites est préparé dans un tube différent. La concentration en parasites est d'environ 600/ μ L. Le marquage de chaque genre et espèce de parasite s'effectue avec les marqueurs respectifs présentés dans la figure 4.37.

Les parasites sont en suspension dans un électrolyte composé d'eau DI et de KCl, dont la conductivité électrique est de 0,015 S/m. La tension du signal appliquée est de 30V. La fréquence du signal est choisie en fonction de la fréquence de coupure du comportement diélectrophorétique de chaque parasite (tableau 4.2).

	<i>Giardia Lambia</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Cryptosporidium muris</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>
Fréquence de coupure	pDEP sur tout le spectre	800kHz	200kHz	800kHz

Tableau 4.2 : Fréquence de coupure du comportement diélectrophorétique des quatre parasites employés pour les expériences de séparation.

Lors des expériences, le mélange de deux parasites est fait dans un nouveau tube. L'échantillon obtenu est mélangé vigoureusement avant chaque dépôt de goutte sur le séparateur. De façon à ce que l'échantillon recouvre bien la totalité de la surface du système après couverture de la goutte par une lame couvre objet, le volume déposé est de 10 μ L. La tension est appliquée pendant 10 minutes. A la fin de l'expérience, les photographies sont prises avec le microscope à épifluorescence (Nikon, modèle Eclipse 80i).

4.5.4 Observations et discussion

La figure 4.38 montre qu'il est possible de séparer les parasites de *Cryptosporidium parvum* et *Giardia Lambia*. Ces deux parasites sont très impliqués dans les infections animales et humaines. Le signal appliqué a une tension de 30V et une fréquence de 300kHz. Les zones A et C montrent le rassemblement important de l'espèce *Cryptosporidium parvum* et une répartition homogène de l'espèce *Giardia Lambia*. Après application du champ électrique, *C. parvum* subit la diélectrophorèse négative et lévite. Il est emporté par les flux de liquide. Les oocystes de *C. parvum* sont rassemblés par le concentrateur. Au contraire, *Giardia Lambia* subit la diélectrophorèse positive. Les kystes de *Giardia Lambia* sont attirés vers les électrodes et ne peuvent être rassemblés par le concentrateur. Ils sont répartis de façon homogène dans tout le réservoir. La zone C de la figure 4.39 est majoritairement remplie de kystes de *Giardia Lambia*, où très peu d'oocystes de *C. parvum* sont présents.

La deuxième observation est le tri de deux espèces de *Cryptosporidium* (*C. muris* et *C. parvum*). A la fréquence de 400 kHz (tension de 30V), *C. muris* est attiré vers les électrodes (DEP positive) alors que *C. parvum* en est repoussé (DEP négative, lévitation). Ainsi, les oocystes de *C. parvum* sont concentrés alors que ceux de *C. muris* sont piégés au fond du réservoir (figure 4.39).

Enfin, le même type d'expérimentation a été effectué pour tenter de séparer *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* (figure 4.40). Le signal appliqué est de 30V et la fréquence est réglée autour de la fréquence de coupure des parasites (800kHz). La taille des deux espèces est similaire. Il n'a pas été possible de les discriminer grâce à la diélectrophorèse. Les deux espèces sont rassemblées par le concentrateur dans les mêmes amas d'oocystes.

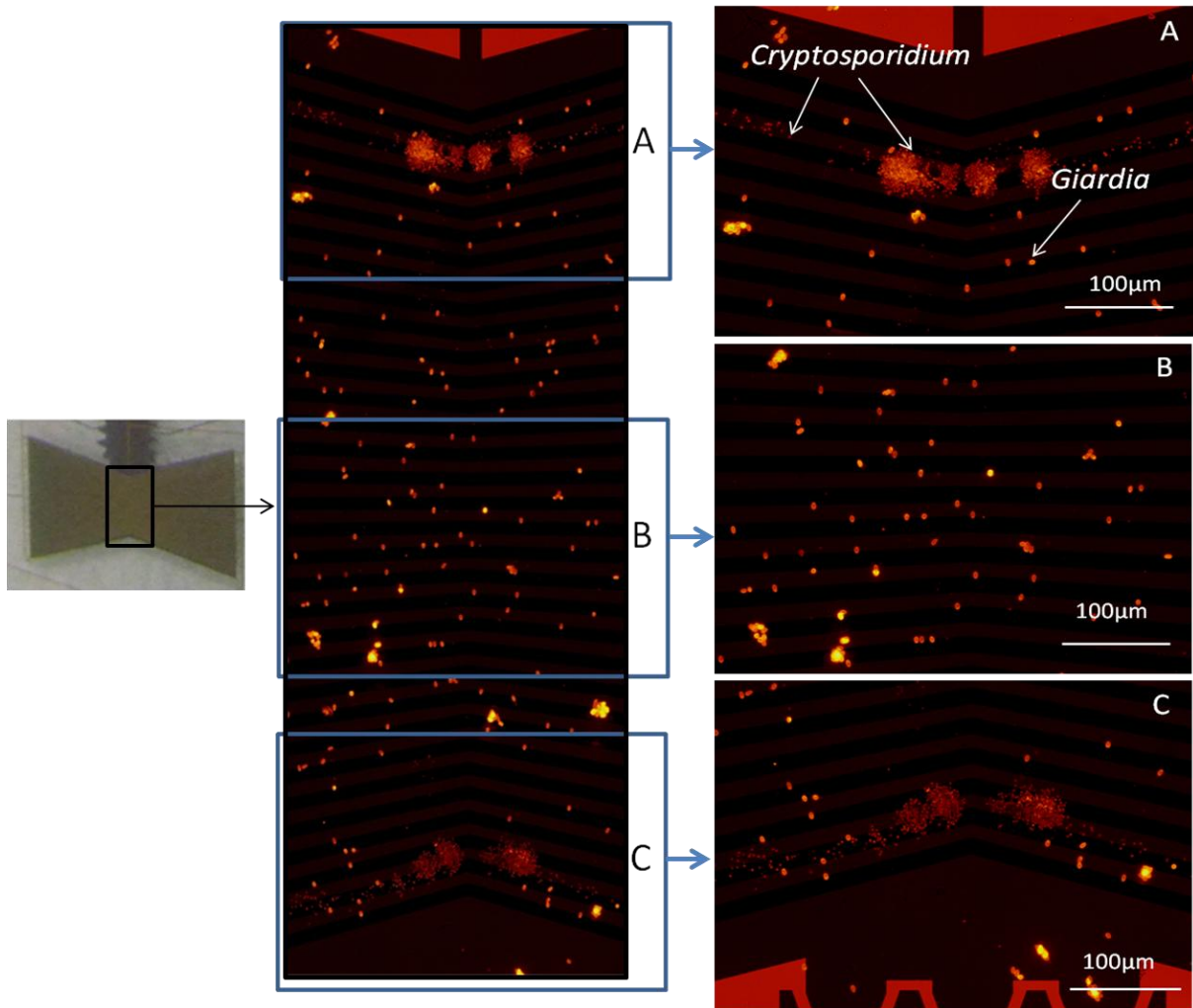


Figure 4.38 : Résultats d'une expérience de séparation entre le parasite *Cryptosporidium parvum* et le parasite *Giardia* ($V=30V$, $f=300kHz$). A et C : zone de concentration du parasite *Cryptosporidium parvum*. B : reste du réservoir où le parasite *Giardia Lambia* est réparti de façon homogène alors qu'il reste très peu de *Cryptosporidium parvum*.

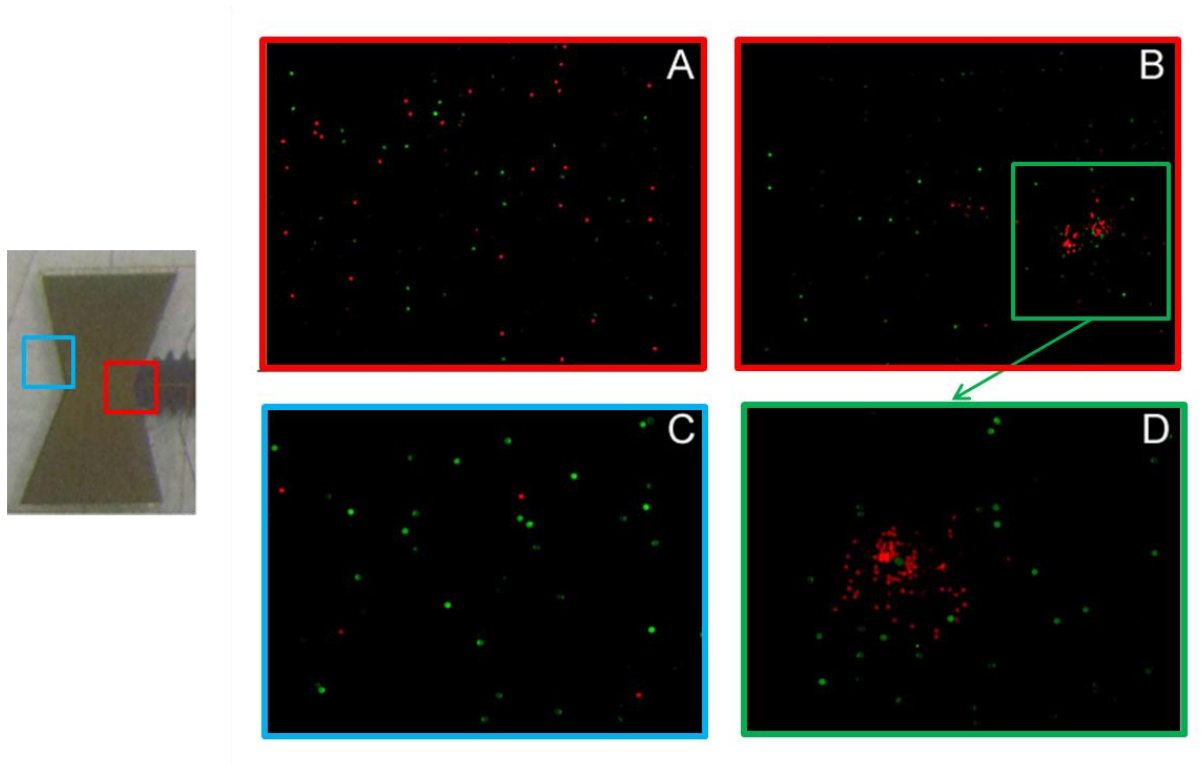


Figure 4.39 : Résultats d'une expérience de séparation entre le parasite *Cryptosporidium parvum* (en rouge) et le parasite *Cryptosporidium muris* (en vert) ($V=30V$, $f=400kHz$). A : avant application du champ électrique. B et D : zones de concentration de *Cryptosporidium parvum* après application du champ électrique. C : zone du réservoir hors de l'espace de concentration après application du champ électrique. *Cryptosporidium muris* est présent en nombre alors que *Cryptosporidium parvum* est rare.

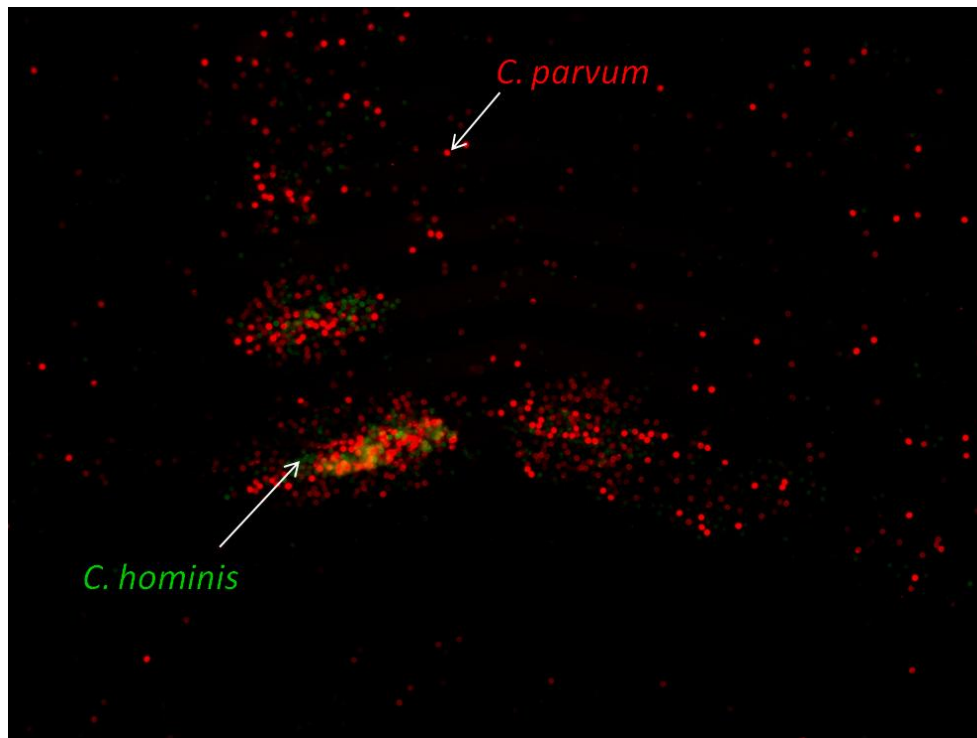


Figure 4.40 : Résultat d'une expérience de séparation avec *Cryptosporidium parvum* (en rouge) et *Cryptosporidium hominis* (en vert) ($V=30V$, $f=800kHz$). Les deux espèces sont concentrées au même endroit, ce qui rend leur séparation impossible.

4.5.5 Conclusion

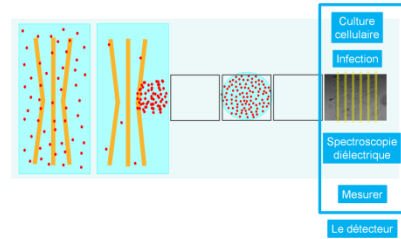
La séparation des deux genres *Cryptosporidium parvum* et *Giardia Lambia* a été observé. Du fait de l'importante différence de taille entre les deux genres (*Giardia Lambia* : forme ovale, $13\mu m * 7-9\mu m$, *Cryptosporidium parvum* : forme circulaire, $4-6\mu m$ de diamètre), la discrimination par diélectrophorèse est aisée. Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* sont concentrés dans la zone de concentration alors que les kystes de *Giardia Lambia* sont présents de manière homogène dans tout le réservoir.

De même, la séparation des deux espèces *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium muris* a été obtenue. La différence de taille entre les deux espèces (*Cryptosporidium parvum* : forme circulaire, $4-6\mu m$ de diamètre, *Cryptosporidium muris* : forme ovale, $7.5-9.8 * 5.5-7\mu m$) est suffisante pour induire une réponse diélectrophorétique différenciée.

Enfin, il n'a pas été possible de séparer *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* avec le séparateur. Les deux espèces possèdent la même taille et la même morphologie (*Cryptosporidium parvum* : forme circulaire, 4-6µm de diamètre, *Cryptosporidium hominis* : forme circulaire, 4-6µm de diamètre). Nous avons observé un comportement diélectrophorétique identique des deux espèces. Les deux espèces sont rassemblées dans les mêmes zones de concentration par le concentrateur. Nous en déduisons que *C. parvum* et *C. hominis* possèdent des propriétés diélectriques semblables. Cette observation nous informe que le phénotype diélectrophorétique n'est pas corrélé au génotype de ces deux espèces.

Pour conclure, ces expérimentations montrent que le dispositif fonctionne également en tant que séparateur. Le système est capable de discriminer des genres et des espèces si ceux-ci sont de tailles différentes. Cependant, *C. parvum* et *C. hominis*, deux espèces de même taille, ne peuvent être différenciées par ce système. Le caractère génotypique de ces deux espèces n'est pas détectable par cette méthode électrique. Néanmoins, la possibilité de séparer et trier divers genres et espèces parasitaires au sein d'un laboratoire sur puce ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude du polyparasitisme par des méthodes simples à mettre en œuvre.

4.6 Le détecteur



Dans sa version finalisée, notre laboratoire sur puce proposera également un détecteur qui permettra de quantifier l'effet des parasites sur un tapis cellulaire. En effet, si les parasites sont infectieux, ils vont infecter les cellules du tapis et par conséquent le modifier. En identifiant un paramètre physique *ad-hoc* et en mesurant la variation de ce paramètre au cours du temps, nous aurons accès à une mesure indirecte de la cinétique de l'infection. Ceci n'est proposé par aucun instrument actuellement.

L'une des premières phases de ce travail est de définir le protocole de culture des cellules biologiques au sein du microsystème. L'objectif de ce travail est de créer des tapis cellulaires de façon contrôlée sur des surfaces inférieures au millimètre carré. Afin de limiter la croissance des cellules à des surfaces submillimétriques, nous réalisons une texturation chimique. Cette texturation est faite de motifs (disques) de nature hydrophile, sur lesquels les cellules vont adhérer et se multiplier, entourés d'une surface continue de nature hydrophobe empêchant l'adhésion des cellules. Nous détaillons ci-dessous le procédé de microfabrication de ces motifs.

4.6.1 Fabrication des motifs de culture cellulaire

Les surfaces sont fabriquées sur substrat de verre (Verre Industrie, France). Le matériau hydrophobe est du Cytop[®] (CTL-809M de la société AGC, Japon) ou de l'OTS (Octadécyltrichlorosilane, Sigma-Aldrich, Allemagne). Le Cytop[®] est déposé par spin-coating alors que le dépôt d'OTS se fait par voie liquide.

Une couche de résine positive AZ 4562 (MicroChemicals, Allemagne) est déposée par spin-coating (vitesse : 3 000 rpm, accélération : 500rpm/s, temps : 40 secondes, recuit : 1min/ μm @ 100°C). L'épaisseur de cette couche est d'environ 7 μm . Un temps de repos d'une dizaine de minutes est nécessaire pour la réhydratation de la résine.

Afin d'éviter la formation de bulles durant l'exposition (production de N₂), l'insolation se fait en deux étapes (énergie d'exposition : 180 mJ, 4 fois 5 secondes à 10 Watts au lieu de 20 secondes en une fois). Le substrat est plongé dans un mélange AZ351B / H₂O (1/3) pendant 1min30 pour la révélation.

Après l'étape de lithographie, un traitement plasma O₂ d'une trentaine de secondes est effectué pour détruire le matériau hydrophobe dans les ouvertures. Le plasma oxygène peut être remplacé par un traitement UV ozone de trente minutes. Juste après cette étape, le masque de résine est dissout dans de l'acétone.

La surface obtenue est fonctionnalisée par un dépôt d'APTES ((3-Aminopropyl)triéthoxysilane) (Sigma-Aldrich). Ce dépôt s'effectue en phase liquide, directement après l'ouverture des zones hydrophiles par plasma Oxygène ou UV ozone. L'APTES est un aminosilane couramment utilisé pour la fixation d'amines primaires sur des surfaces en verre ou en silicium grâce à la fonction silane qu'il contient. Les amines primaires ainsi déposées permettent l'adhésion de protéines et autres biomolécules. Dans notre cas, la présence de ces fonctions amines sur la surface est favorable à l'adhésion cellulaire et à la prolifération des cellules *via* les protéines membranaires.

La solution préparée se compose de :

- 47,5 mL de méthanol
- 2,5 mL d'eau désionisée (EDI)
- 50 µL d'APTES

Après avoir mélangé l'eau et le méthanol, 50 µL d'APTES sont ajoutés à la solution. Les volumes peuvent être multipliés si besoin. Le substrat est plongé dans cette solution pendant trente minutes dans un bain à ultrasons ou pendant une heure sur une table d'agitation. Le bécher est recouvert par un couvercle en téflon afin d'éviter toute pollution. La surface est ensuite rincée à l'EDI puis séchée à l'azote. Le stockage de la surface se fait sous flux d'azote pour limiter les pollutions rapides.

Les motifs fabriqués sont des disques de diamètres différents (1000µm, 750µm, 500µm et 250µm). Après l'étape de fabrication des motifs, nous réalisons la culture des cellules biologiques.

4.6.2 Culture cellulaire

Le protocole de culture cellulaire est décrit dans l'annexe (Annexe B). Trois types cellulaires, communément employés comme modèle *in vitro* d'infestation de *Cryptosporidium parvum*, sont mis en culture sur ces surfaces. Ces lignées sont des cellules issues d'adénocarcinome Iléo-caecal humain (HCT-8, ECACC 90032006), d'adénocarcinome du colon humain (Caco-2, ECACC 86010202) ou des cellules de chien issues de rein de cocker (MDCK : Madin Darby Canine Kidney, ECACC 84121903). Une goutte de 100 μ L de cellules est déposée sur les motifs (figure 4.41). Le temps d'incubation est de 24h.

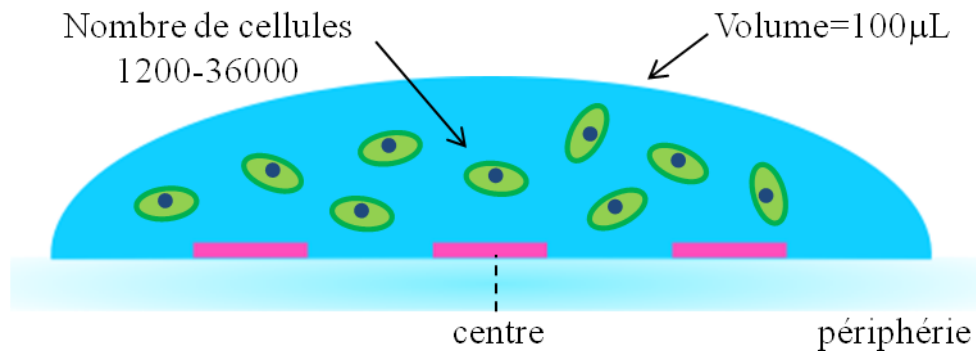


Figure 4.41 : Schéma du protocole expérimental de la culture cellulaire sur les motifs.

Les trois lignées présentent des comportements très différents. Nous observons des variations sur la qualité : i) l'adhésion sur le support, ii) l'aptitude à donner des surfaces confluentes, iii) l'aptitude à ne pas faire de multicouches et iv) l'aptitude à ne se fixer que sur le motif hydrophile (vs hydrophobe).

Quelques résultats de culture sont présentés à la figure 4.42. Le tableau 4.3 présente un résumé de ces résultats. Pour les cellules Caco2, quelle que soit la surface du disque, la confluence à 100% des tapis cellulaires après 24h d'incubation n'est pas atteinte, quelle que soit la concentration initiale de cellules (concentration maximale employée : 9 600 cellules/100 μ l). Les niveaux de confluence (80% à 90%) sont obtenus avec des disques de 1 000 μ m de diamètreensemencés avec 9 600 cellules dans 100 μ L. Parallèlement à cette observation, les dispositifs portant des disques de 250 μ m de diamètre n'ont pas présenté de

cellules adhérentes. Sur les autres dispositifs (portant des disques de 500 μm à 1 000 μm), les résultats obtenus mettent clairement en évidence un défaut d'adhésion cellulaire sur les matrices hydrophiles, associé à un faible étalement des cellules. En effet les cellules ayant réussi à adhérer au substrat hydrophile gardent une forme sphérique caractéristique d'un manque d'adhésion efficace. De plus certaines cellules Caco2 présentent une propension marquée à se fixer sur les zones hydrophobes des dispositifs, conduisant à la présence d'amas cellulaires en dehors des disques d'intérêt. Enfin, les cellules Caco2 se développent également en produisant des superpositions de couches de cellules (plurilayer). La formation de ces amas cellulaires suggère ainsi que ce type cellulaire ne serait pas propice à son utilisation à des fins d'analyses en tant que bio-détecteur.

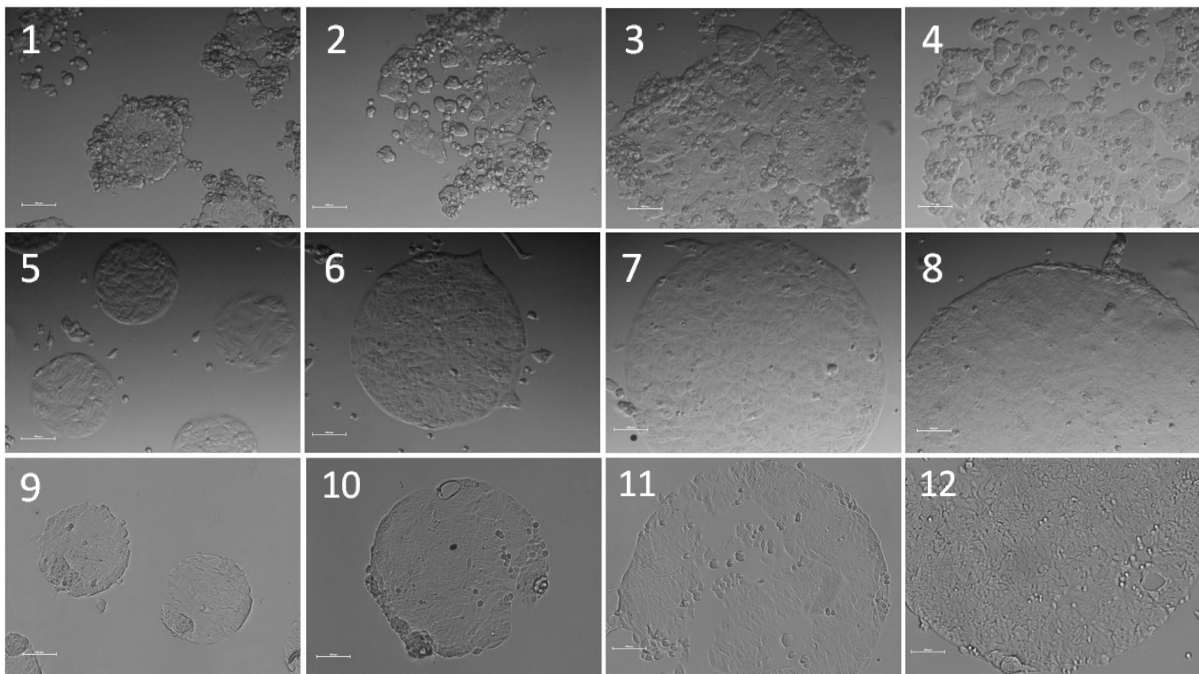


Figure 4.42 : Culture cellulaire de trois lignées de cellules (Caco2, MDCK, HCT8). La goutte déposée est de 100 μL . Le temps d'incubation est de 24h. Le nombre de cellules est de 9 600 (photographies 1-4), 16 000 (photographies 5 et 6), 32 000 (photographies 7 et 8), 1 200 (photographies 9), 600 (photographies 10) et 24 000 (photographies 11 et 12). 1-4 : Caco2 sur disques de respectivement 250, 500, 750 et 1 000 μm de diamètre. 5-8 : MDCK sur disques de respectivement 250, 500, 750 et 1 000 μm de diamètre. 9-12 : HCT8 sur disques de respectivement 250, 500, 750 et 1 000 μm de diamètre. La barre d'échelle blanche correspond à une distance de 100 μm .

Les résultats obtenus avec la lignée cellulaires MDCK mettent en évidence une absence de développement des cellules lors d'un ensemencement avec une dilution supérieure ou égale à 8 000 cellules/100 μ l. Cette observation suggère à nouveau que la limite de dilution est atteinte et que les cellules, en perdant le contact avec leur voisines, ne parviennent pas à maintenir les conditions micro-environnementales optimales à leur survie. Des niveaux de confluence de 100% après 24h d'incubation sont observés sur des disques de 250 μ m et de 500 μ m de diamètre ensemencés avec 16 000 cellules dans 100 μ L. La confluence à 100% après 24h d'incubation est également atteinte sur des disques de 750 μ m et 1000 μ m de diamètre lorsqu'ils sont ensemencés avec un dépôt initial de 32 000 cellules/ 100 μ l.

Enfin, les résultats obtenus avec les cellules HCT-8 montrent que la confluence des tapis cellulaires après 24h d'incubation est de 100% sur les disques de 250 μ m de diamètre lorsque le dispositif est ensemencé avec seulement 1 200 cellules. Sur les disques de 500 μ m de diamètre, la confluence est de 100% lorsque le dépôt initial contient 6 000 cellules. Pour les disques de 750 μ m et 1000 μ m de diamètre, le nombre maximal de cellules testé (24 000 cellules) n'est pas suffisant pour obtenir des tapis cellulaires confluent à 100%. La confluence maximale atteinte dans ces conditions de culture est de 80%.

Au niveau de la lignée HCT-8, une très faible pousse cellulaire (voire une absence totale de cellules en culture) est observée sur les disques de grande taille ensemencés avec très peu de cellules (1 200 cellules). Cette observation suggère un effet de dilution trop important conduisant dans ces conditions expérimentales à l'absence de contacts intercellulaires. Cette contrainte spatiale conduirait à une inhibition de la croissance cellulaire voire une diminution de la survie des cellules en l'absence de contacts intercellulaires.

Il est à noter que les MDCK comme les cellules HCT-8 présentent une très forte affinité pour les surfaces hydrophiles. Cette propriété est marquée par la quasi absence de cellules adhérentes sur les surfaces hydrophobes. De plus, ni les HCT-8, ni les MDCK ne présentent de formations multicouches prononcées.

		Taille des disques (diamètre)			
		250µm	500µm	750µm	1 000µm
Caco2	9 600 cellules/100µl	Peu d'adhérence et plurilayer			
MDCK	8 000 cellules/100µl	absence de développement cellulaire			
	16 000 cellules/100µl	Confluence à 100%		N/A	N/A
	32 000 cellules/100µl	N/A	N/A	Confluence à 100%	
HCT8	1 200 cellules/100µl	Confluence à 100%	Pousse cellulaire très faible		
	6 000 cellules/100µl	N/A	Confluence à 100%	N/A	N/A
	24 000 cellules/100µl	N/A	N/A	Confluence à 80%	

Tableau 4.3 : Résumé des expériences de cultures cellulaires sur des motifs en forme de disque (diamètres : 250, 500, 750 et 1 000µm) des trois lignées de cellules testées (Caco2, MDCK, HCT8).

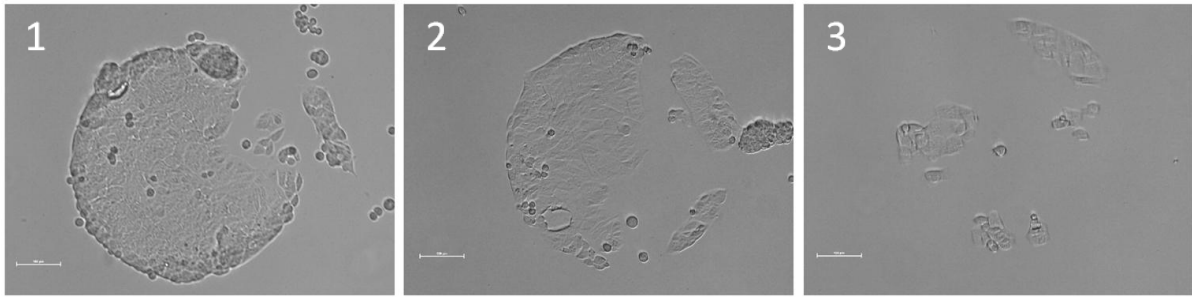


Figure 4.43 : Différence de confluence pour des tapis cellulaires de cellules HCT8 sur des disques de 500µm de diamètre. 1-3 : du centre vers la périphérie de la goutte déposée (figure 4.41). La barre d'échelle blanche correspond à 100µm.

Les expériences montrent également que les disques situés au centre de la goutte sont plus confluent que les disques périphériques (cf. figure 4.43). Nous n'avons pas encore identifié le ou les phénomènes responsables de cette non-uniformité. Une hypothèse serait que cette observation serait due à la sédimentation, le nombre de cellules étant plus important au centre de la goutte qu'à sa périphérie, du fait de sa forme (plus épaisse au centre qu'à la périphérie).

Pour conclure, ces premiers résultats démontrent la faisabilité d'une culture cellulaire sur des surfaces submillimétriques. La taille minimale des disques testés est de 250 µm de diamètre. A priori, il n'y a pas de contraintes limitant la diminution de ces zones de culture. Les propriétés cellulaires observées, associées à l'aptitude des cellules à soutenir l'infection par des oocystes de *Cryptosporidium*, font des lignées HCT-8 et MDCK de bons candidats pour le développement du détecteur biologique.

4.7 Conclusion

Ce chapitre présente les résultats expérimentaux de ces travaux. Il rassemble les expériences liées au système de concentration (concentrateur, extracteur et séparateur), ainsi que les expériences préliminaires de cultures cellulaires.

Concernant le concentrateur, une étude expérimentale sur une centaine de géométries d'électrodes a permis de mettre en lumière l'importance de la largeur des électrodes et de la distance séparant les électrodes dans l'équilibre des phénomènes impliqués. L'influence de ces deux paramètres a été observé sur les trois forces majeures créées lors de l'application d'une différence de potentiel : la force diélectrophorétique, la force électro-osmotique et la force AC électrothermique. Ce travail a permis de concevoir un concentrateur de grande taille (8mm de long), d'une surface de 28mm² (le volume correspondant est compris entre 5 et 7μL).

Ce concentrateur de grande taille a été couplé à un dispositif d'extraction utilisant la technologie d'électromouillage. Ce système a été testé pour concentrer des oocystes de *Cryptosporidium parvum*. Le dispositif peut fonctionner selon trois modes différents. Le premier est le mode concentrateur et permet le rassemblement de particules sur les bords du réservoir. Le deuxième mode est le mode extracteur. Les particules rassemblées sont extraites du réservoir principal grâce à une étape de création de goutte par EWOD. Le troisième mode est le mode séparateur. Il consiste en la séparation de différentes espèces de parasites grâce à la diélectrophorèse.

L'efficacité du concentrateur a été mesurée grâce à un décompte manuel des particules. En mode concentrateur, plus de 70% des parasites présents dans le réservoir sont rassemblés dans un espace équivalent à un volume de 300nL. Il en résulte une concentration finale de 5200 oocystes/μL, ce qui correspond dans nos expériences à une multiplication de la concentration par 12.

En mode extracteur, le dispositif optimal permet une multiplication de la concentration par 4 dans un volume de goutte de 800nL. Cependant, le manque de reproductibilité de l'étape de création de goutte par EWOD limite fortement ce bon résultat. La concentration moyennée

sur les quatre expériences d'extraction qu'il a été possible de réaliser est de 2,4. Ce résultat est équivalent à celui exposé dans la littérature pour ce genre de système tout électrique. Cependant, il est nécessaire de travailler pour améliorer la reproductibilité. Nous avons identifié deux orientations : 1) le matériau diélectrique, 2) le parallélisme de la base et du capot.

En mode séparateur, la capacité du système à trier différents genres et espèces de parasites a été démontrée. Des expériences ont montré la possibilité de séparer *Cryptosporidium parvum* et *C. muris*, ainsi que *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia*. *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* n'ont pu être séparés du fait de propriétés morphologiques et diélectriques semblables. A ce jour, on ne peut distinguer ces deux espèces parasitaires très semblables qu'à partir de leurs profils génétiques et antigéniques, ou par la mesure du pouvoir infectieux en fonction de l'hôte (*Cryptosporidium hominis* ne peut infecter que l'homme).

Enfin, les études préliminaires sur la conception du détecteur d'infectivité des parasites ont montré que les cellules de type MDCK et HCT8 sont de bons candidats pour la culture de tapis cellulaires sur des disques de diamètres submillimétriques. La plus petite taille des disques testés est de 250µm de diamètre. La confluence du tapis cellulaire est obtenue au bout de 24 heures d'incubation. La concentration minimale (pour chaque type cellulaire) permettant l'obtention d'un tapis cellulaire confluent a été identifiée. Elle est de 8000 cellules/100µL pour les cellules de type MDCK, et de 1200 cellules/100µL pour les cellules de type HCT8 pour les tailles de disques supérieures à 250µm de diamètre.

Bibliographie du chapitre 4

[Fan et al., 2008] Fan, S.-K., Huang, P.-W., Wang, T.-T., & Peng, Y.-H. (2008). Cross-scale electric manipulations of cells and droplets by frequency-modulated dielectrophoresis and electrowetting. *Lab Chip*, 8(8), 1325–1331.

[Gong & Kim, 2008] Gong, J. & Kim (2008). Direct-referencing two-dimensional-array digital microfluidics using multi-layer printed circuit board. *Journal of microelectromechanical systems*, 17(2), 257–264.

[Houssin, 2011] Houssin, T. (2011). *BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance*. PhD thesis, Université de Lille Nord de France.

[Houssin et al., 2010] Houssin, T., Follet, J., Follet, A., Dei-Cas, E., & Senez, V. (2010). Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5), 1122–1129.

[Piret, 2010] Piret, G. (2010). *Nanofils de silicium pour une analyse sensible de biomolécules par spectrométrie de masse et pour l'adressage fluide de cellules, en vue des applications laboratoires sur puce et biopuces*. PhD thesis, Université Lille Nord de France.

[Sturbaum et al., 2008] Sturbaum, G. D., Schaefer, D. A., Jost, B. H., Sterling, C. R., & Riggs, M. W. (2008). Antigenic differences within the cryptosporidium hominis and cryptosporidium parvum surface proteins p23 and gp900 defined by monoclonal antibody reactivity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 159(2), 138–141.

[Thompson & Smith, 2011] Thompson, R. & Smith, A. (2011). Zoonotic enteric protozoa. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 70–78.

[Wacogne et al., 2008] Wacogne, B., Pieralli, C., Roux, C., & Gharbi, T. (2008). Measuring the mechanical behaviour of human oocytes with a very simple su-8 micro-tool. *Biomedical Microdevices*, 10(3), 411–419.

5 : Conclusion générale et perspectives

5.1 Conclusion générale

Nous avons exposé dans ce manuscrit la conception et l'intégration d'un système de concentration de microparticules au sein d'une plateforme de microfluidique digitale destinée aux applications de type laboratoire sur puce, pour la mesure du pouvoir infectieux d'agents pathogènes présents dans l'eau.

Dans le chapitre 1, nous avons décrit les problématiques liées à la gestion de l'eau sur notre planète. Nous avons souligné les besoins urgents en outils de contrôle dans les pays en voie de développement, mais aussi dans les sociétés dites développées. Dans un premier temps, les outils et méthodes de détection dites classiques ont été présentés, en distinguant les micropolluants non-vivants et les microorganismes. Dans un deuxième temps, les applications des laboratoires sur puce dans le domaine de l'eau ont été exposées. Les avantages de ces nouveaux outils ont été discutés. Dans un troisième temps, nous avons développé la problématique liée à l'objet principal de cette étude. Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des protozoaires entérique émergents qui posent un véritable problème de santé publique dans le monde entier. Les principales méthodes actuelles de détection et de mesure du pouvoir infectieux de ces parasites ont été présentées. Enfin, après l'état des lieux des avantages et inconvénients des techniques existantes et en cours de développement, nous avons proposé une solution de type biocapteur au sein d'une plateforme microfluidique comme solution alternative de la mesure du pouvoir infectieux.

Dans le chapitre 2, nous avons établi le cahier des charges des fonctions à remplir par la plateforme. Le système envisagé devait concentrer l'échantillon composé de parasites en suspension dans un liquide, créer et déplacer l'échantillon dans un volume inférieur au microlitre grâce à la technique EWOD, puis l'acheminer vers un site d'analyse composé de tapis cellulaires de quelques centaines de μm^2 de surface. Nous avons défini que le dispositif ne devait employer que des techniques de type électrique pour exécuter chacune des fonctions. Ce choix a été dicté par le besoin d'une forte souplesse au niveau de la programmation du système, d'une intégration simple à mettre en œuvre, d'une parallélisation aisée. Tout d'abord, nous avons exposé des éléments théoriques de la technique EWOD, et de la création de goutte. Puis, nous avons fait un état des lieux des principales techniques de

manipulations et de concentration de micro-objets. Nous avons également présenté les techniques de concentration employées en microfluidique digitale de type EWOD. A partir de cet état de l'art, nous avons choisi d'employer la technique de diélectrophorèse pour remplir la fonction de concentration et de l'intégrer à un dispositif de déplacement de goutte par EWOD. A la fin de ce chapitre, nous avons exposé les premières observations obtenues avec divers concentrateurs et les avons confrontées à nos prédictions. Nous avons observé l'existence de phénomènes électrocinétiques supplémentaires à la diélectrophorèse capables de concentrer les microparticules. De plus, nous avons découvert une forte influence de la géométrie des électrodes sur le résultat de la fonction de concentration. Nous en avons conclu que le phénomène de concentration est complexe et qu'il nécessite une étude approfondie des phénomènes électrocinétiques.

C'est pourquoi, dans le chapitre 3, nous avons mené une étude théorique des phénomènes électrocinétiques générés par l'application d'un champ électrique dans un liquide. Nous avons présentés les équations régissant les trois phénomènes principalement impliqués (électro-osmose, diélectrophorèse et électrothermique AC). Puis nous avons utilisé un modèle en deux et trois dimensions à l'aide du logiciel COMSOL Multiphysics[®] couplé à Matlab[®]. Nous avons exposé les objectifs de ces deux modèles complémentaires ainsi que leur caractéristiques. Cette étude a mis en lumière une compréhension accrue des phénomènes, de leur prédominance en fonctions des paramètres tels que la fréquence et l'amplitude du signal électrique et la conductivité électrique du milieu. De plus, les modèles ont apporté des éléments quantitatifs sur les paramètres géométriques des électrodes. La confrontation du modèle 3D avec les premières observations expérimentales a permis de valider la démarche scientifique et d'apporter des éléments cruciaux pour la conception d'un concentrateur optimisé, ayant une surface plus large afin de pouvoir procéder à l'étape de création de goutte par EWOD.

Dans le chapitre 4, nous avons présenté les observations et discussions des expériences effectuées avec différents dispositifs de concentration. Les étapes de microfabrication sont exposées. Tout d'abord, nous avons testé des dispositifs comprenant des dizaines de concentrateurs différents, en taille et en géométrie, afin d'extraire les paramètres géométriques important en vue de l'optimisation du système. Ce travail expérimental, conjugué à l'analyse numérique du chapitre 3, a permis de concevoir un concentrateur dit

‘optimisé’ capable de contenir un échantillon d’un volume compris entre 5 et 7 μL . Le concentrateur optimisé a été intégré dans un système de type EWOD. Dans un premier temps, nous avons employé le système en mode concentrateur avec une solution de parasites en suspension, où seules les électrodes de concentration ont été caractérisées. Dans cette configuration, le concentrateur est capable de multiplier la concentration en parasites par 12. Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l’étape de création de goutte par EWOD. Dans ce cas, le système est en mode extracteur. Nous avons créé des gouttes de 800nL contenant les parasites initialement rassemblés par le concentrateur. La preuve de concept a été établie, avec une multiplication par 4 de la concentration en parasites dans le meilleur des cas. Ce résultat est équivalent à celui du système exposé dans la littérature. Cependant, la reproductibilité de l’étape de création de goutte est faible. Nous avons discuté ces observations et pointé les divers axes d’amélioration en vue d’un système robuste. Enfin, nous avons testé le système en mode ‘séparateur’ pour répondre à des besoins en biologie, notamment sur la thématique du polyparasitisme. Nous avons employé deux genres de parasites principalement impliqués dans les infections parasitaires humaines et animales et trois espèces du genre *Cryptosporidium*. Le séparateur est capable de discriminer les genres et certaines espèces selon leur différence de taille et de forme.

La concentration de parasites dans un système EWOD a été effectuée avec succès même si des améliorations doivent être apportées pour une robustesse accrue. Cette fonction principale ouvre la possibilité de mener des expériences d’infection de tapis cellulaires sur une puce, en évitant la périlleuse étape de concentration par centrifugation et prélèvement du surnageant sans perdre l’échantillon. La perspective de ce travail est le développement d’une plateforme complète de mesure du pouvoir infectieux par l’inoculation de parasites sur des tapis cellulaires de taille micrométrique. Elle a été confirmée par des résultats préliminaires de cultures cellulaires sur des surfaces hydrophobes composées d’ouvertures fonctionnalisées. Des modèles cellulaires traditionnellement employés pour la mesure du pouvoir infectieux et l’étude de médicaments ou désinfectants *in vitro* ont été cultivés avec succès sur ces surfaces micro-dessinées. Les zones de culture les plus petites ont 250 μm de diamètre.

En conclusion, ces travaux ouvrent la voie au développement d'une plateforme de type laboratoire sur puce intégrant les étapes de concentration et création de l'échantillon de parasites en vue d'une analyse électrique en microenvironnement. Les aspects culture cellulaire et analyse électrique vont être développés dans une nouvelle thèse au sein de l'équipe. La souplesse du futur dispositif est garantie par l'emploi de techniques électriques facilement intégrables. De ce fait, nous pouvons imaginer la possibilité d'une plateforme de mesure du pouvoir infectieux grâce à des analyses en parallèle d'un même échantillon sur divers modèles cellulaires spécifiques d'un agent pathogène. L'analyse groupée des différentes réponses obtenues en parallèle permettrait de conclure sur leur pouvoir infectieux. De plus, ce système serait également un atout pour l'étude de nouveaux médicaments et désinfectants.

5.2 Vers une plateforme de diagnostic de maladies parasitaires et d'étude de médicaments et désinfectants

Ce travail de thèse pose les premières bases d'un microsystème de type laboratoire sur puce pour l'analyse du pouvoir infectieux d'agents pathogènes. Ce dispositif intègrera la concentration de l'échantillon dans un système de microfluidique dite discrète utilisant la technologie de l'électromouillage. Ce microsystème permettra de concentrer des parasites contenus dans quelques microlitres, d'extraire ces parasites dans un volume de quelques centaines de nanolitres et de transporter cet échantillon vers une zone d'analyse électrique. Cette zone, constituée d'un tapis cellulaire cultivé sur des surfaces de quelques centaines de microns de diamètres, formera le biocapteur capable de mesurer la cinétique de l'infection du parasite sur son hôte.

L'utilisation de la technique EWOD ouvre la possibilité de paralléliser et de programmer les opérations nécessaires au protocole d'analyse. L'automatisation et la parallélisation de l'étape de concentration de l'échantillon, puis, à terme de la culture de cellules, seront possibles sur la même puce. Par conséquent, on peut imaginer de nombreuses lignes d'analyses en parallèle. Chaque ligne est dédiée à un échantillon particulier, avec en entrée la concentration de l'échantillon et en sortie l'analyse électrique permettant de mesurer l'effet des parasites sur ces tapis cellulaires. Sous réserve de développer des modèles cellulaires discriminants et spécifiques d'un type parasitaire, il serait alors possible d'envisager cet outil comme élément capable de diagnostiquer une maladie parasitaire chez un individu, grâce à l'analyse parallèle de l'effet de l'échantillon sur un panel de cellules modèles. La multi-analyse des divers modèles cellulaires présents dans le biocapteur permettrait de connaître l'origine parasitaire de la maladie développée par un individu ou un animal. Cette plateforme serait donc un outil de diagnostic clinique et vétérinaire.

Le cas particulier du protozoaire *Cryptosporidium parvum* utilisé dans ce travail ouvre la perspective du développement d'une plateforme d'étude de médicaments et désinfectants capables d'annihiler l'effet du parasite sur l'organisme. Cette plateforme serait un substitut du protocole standard, le plus efficace actuellement, qui utilise des modèles animaux (souriceaux, souris adultes immunodéprimées). Du fait du fort pouvoir d'intégration dû à la parallélisation, il serait possible d'étudier l'effet de nombreuses molécules sur divers modèles de tissus cellulaires sur la même puce, de façon automatique. Le gain de temps et d'argent peut être considérable, sachant que le protocole standard repose sur l'élevage de souris dans des infrastructures spécifiques et donc coûteuses. La plateforme serait également avantageuse d'un point de vue éthique, puisqu'elle pourrait remplacer l'utilisation d'animaux.

Pour la suite de ces travaux, il est nécessaire de poursuivre les recherches sur la culture de tapis cellulaire sur surfaces submillimétriques en essayant par exemple de réduire la taille de ces surfaces. Le choix de la taille du tapis cellulaire (nombre de cellules composant le tapis) conditionnera le dimensionnement des électrodes de mesure électrique. L'intégration de ces électrodes sur les surfaces de culture cellulaire permettra la mesure indirecte d'un paramètre *ad-hoc* (à déterminer, par exemple la conductivité électrique du tapis de cellules) qui représentera l'état physiologique du tapis cellulaire. L'étape suivante consisterait à établir le protocole d'infestation des cellules par le parasite puis d'évaluer la cinétique de l'infection parasitaire sur ces tapis grâce à la mesure électrique. L'ultime étape serait alors l'intégration du biocapteur au sein de la plateforme de microfluidique discrète employant la technologie de l'électromouillage. Cette ultime phase sera très délicate car il faudra être capable de garantir les conditions optimales de développement des cellules biologiques dans des gouttes de quelques microlitres (voire centaines de nanolitres), tout en maintenant les fonctionnalités du convoyeur. Les problèmes inhérents au déplacement par électromouillage de gouttes conductrices et fortement chargées en protéines devront être solutionnés. L'emploi de surfactant est une orientation intéressante pour ce type de problématique. De plus, la possibilité d'établir une interface digitale/continue, continue/digitale, pourrait ouvrir des perspectives d'intégration accrues. En effet, nous pourrions imaginer un système d'approvisionnement des cellules biologiques en milieu de culture dans des canaux de façon continue, alors que les parasites seraient transportés de manière discrète (dans des gouttes) vers le tapis cellulaire à infecter.

Annexes

Annexe A : Problématique du poly-parasitisme au niveau générique

L'impact clinique des infections zoonotiques liées à des protozoaires parasites d'origine entérique est de plus en plus important dans les pays en voie de développement. L'absence de conditions sanitaires favorables, le faible niveau d'hygiène, la proximité avec des animaux réservoirs d'agents zoonotiques (chien, bétail...) sont des facteurs majeurs de risques pour la santé humaine. Dans de telles circonstances il n'est pas étonnant que des infections mixtes aient lieu avec des agents infectieux de plusieurs espèces voire de plusieurs genres parasitaires. En fait, il ressort des données épidémiologiques que les infections par un unique agent parasitaire sont rares [Thompson & Smith, 2011]. Toutefois, l'impact des coïnfections sur la santé humaine n'a que très peu été prise en compte concernant les parasites entériques, même si cette notion a bien été développée pour d'autres genres parasitaires [Cox, 2001] tels que *Plasmodium* (agent du paludisme) et *Schistosoma* (agent de la bilharziose).

De plus, il semble que des infections multi agents par des protozoaires parasites entériques auraient des effets additifs sur la pathogénicité des agents, conduisant dans certains cas à une augmentation de la sévérité des signes cliniques observés chez le patient. Il est ainsi à noter que la majorité des études visant à déterminer l'impact des maladies parasitaires sur la santé humaine ne prennent pas en considération cette morbidité accrue du fait du co-parasitisme [Payne et al., 2009]. D'autres travaux, au contraire, suggèrent que le poly parasitisme conduirait à une stimulation de plusieurs composants du système immunitaire et à des interactions compétitives. Ces effets agissant en synergie seraient à la base d'une diminution de la pathogénicité d'au moins un des agents infectieux entériques.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont été menées pour développer les outils moléculaires en épidémiologie. Ainsi, alors que les protozoaires parasites entériques ne devraient plus être considérés de façon isolée pour mieux appréhender leur impact sur la santé de l'hôte, peu d'outils ont été mis en œuvre pour améliorer les techniques d'extraction et de séparation des agents pathogènes en situation de co-infestations.

A.1 Problématique du poly-parasitisme au niveau spécifique : exemple de *Cryptosporidium spp* chez l'homme et le veau

La prévalence la plus élevée pour des parasites du genre *Cryptosporidium* est retrouvée chez des individus jeunes (enfants de moins de 2 ans, veaux de moins de 2 semaines...). Chez les enfants, le spectre de symptômes est large allant de la diarrhée aiguë, à la diarrhée chronique ou au vomissement jusqu'à l'absence complète de symptômes [Bern et al., 2002]. Chez les patients sidéens, la diversité des symptômes est liée au statut immunitaire. Ainsi, les patients présentant un nombre de lymphocytes T CD₄ (LT CD₄) inférieur à 200 cellules/mm³ développeront une diarrhée chronique sévère [Flanigan et al., 1992]. Toutefois, une étude menée sur des patients péruviens contaminés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a mis en évidence que 38% d'entre eux avaient des diarrhées alors que 64% présentaient un taux de LT CD₄ inférieur à 200 cellules/mm³. La cause de ces variations n'a pas été clairement établie. Toutefois, il semblerait que ces variations pourraient être le fait de co-infestations par différents espèces de *Cryptosporidium*.

Sur les 22 espèces de *Cryptosporidium* actuellement validées [Fayer et al., 2005], 9 d'entre elles ont été décrites chez l'homme : *C. parvum* ; *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. cuniculus*, et *C. ubiquitum*. *C. parvum* et *C. hominis* sont les deux espèces présentant la plus forte prévalence chez l'homme [Xiao et al., 2001]. De récents travaux [Bushen et al., 2007] ont montré une association possible entre ces deux organismes conduisant à des manifestations cliniques différentes. *C. hominis* serait ainsi associé à des symptômes plus sévères.

Parallèlement à ces observations chez l'homme, des études menées sur des veaux ont permis de montrer le rôle de réservoirs parasitaires tenu par ces animaux. Les études épidémiologiques ont mis en évidence une variation des espèces de *Cryptosporidium* en fonction de l'âge des veaux. Les animaux les plus jeunes (moins de 2 mois) excrètent majoritairement des oocystes de *C. parvum*, puis des oocystes de *C. bovis* et *C. ryanae* avant d'excréter majoritairement des oocystes de *C. andersoni*. Les espèces *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni* n'étant pas décrites chez l'homme, ces travaux [Santín et al., 2007, Feng et al.,

2007], montrent l'importance des veaux de moins de 2 mois dans le risque de transmission zoonotique des oocystes de *Cryptosporidium*.

Fayer et al. [Fayer et al., 2005] suggèrent que le pic de prévalence observé chez de jeunes veaux était dû à l'immaturation du statut immunitaire. Ils suggèrent également que la faible excrétion d'oocystes de *C. parvum* chez des animaux plus âgés reflète le développement de l'immunité qui protège les animaux contre une nouvelle infestation. Ainsi, des animaux initialement infectés par des oocystes de *C. parvum* sont capables d'excréter des oocystes de *C. bovis* lors d'une seconde infestation mais pas de *C. parvum*) [Fayer et al., 2005]. Les auteurs avaient conclu que l'immunité acquise contre *C. parvum* ne s'était pas étendue contre *C. bovis*. L'étude séquentielle menée par Follet et al. [Follet et al., 2011] montre qu'une infestation par *C. parvum* ne protège pas contre le risque d'une nouvelle contamination par une autre espèce de *Cryptosporidium* (ni *C. bovis* ni *C. ryanae*) et réciproquement. Toutefois, la compréhension des mécanismes induits aux périodes de transition d'une espèce de *Cryptosporidium* à une autre nécessite de déterminer l'évolution quantitative et la proportion relative des différentes espèces parasitaires présentes en même temps ou séquentiellement.

A.2 Les limites techniques en situation de co-infestation

L'ensemble de ces études appréhendant la notion de co-infestation, qu'elles se basent au niveau du genre ou de l'espèce, se trouvent souvent confrontées à des problèmes techniques dus aux méthodes moléculaires employées. Ainsi, l'analyse de séquences d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 18S classiquement employée pour déterminer l'espèce de *Cryptosporidium* est très difficilement exploitable en situation de co-infestation. En effet, dans ce contexte, les électrophorogrammes issus du séquençage se chevauchent lorsque deux espèces de *Cryptosporidium* sont présentes. Ce chevauchement rend la lecture, et par voie de conséquence l'analyse, impossible.

Parallèlement à ces limites d'analyse, Feng et al [Feng et al., 2007] suggèrent qu'en situation de co-infestation, seule l'espèce excrétée de façon majoritaire est amplifiée par les méthodes moléculaires courantes conduisant à un diagnostic artefactuel de mono infestation. Pour ces

auteurs, l'observation séquentielle d'espèces de *Cryptosporidium* associées à certaines périodes de la vie des animaux serait donc liée à des artefacts de détection.

Pour lever ces limites techniques et mieux appréhender ce qu'il se passe en situation de co-infestation il est donc important de développer des outils séparant de façon simple des protozoaires parasites entériques impliqués en santé humaine et/ou animale.

Cet outil trouverait également son application dans la compréhension des profils de développement parasitaire en fonction du temps et présenterait finalement l'avantage de pouvoir purifier, par leurs propriétés diélectrophorétiques et leur masse, des parasites morphologiquement proches.

Cet outil de séparation trouverait également son intérêt en amont d'un dispositif visant à tester le pouvoir infectieux des oocystes de *Cryptosporidium*. En effet, en situation de co-infestation, la discrimination des espèces permettrait de cibler les parasites à risque zoonotique dans le test et de s'affranchir d'effets sur le tapis cellulaire qui seraient liés à la présence d'oocystes ne présentant pas de risque pour l'homme.

Enfin, il est à noter qu'à ce jour, peu d'outils sont disponibles en routine pour discriminer les oocystes issus de différentes espèces de *Cryptosporidium*. La taille, l'espèce hôte, l'aptitude à infecter certains types cellulaires ou certains animaux de laboratoire et les profils génétiques sont des critères de distinction des espèces de *Cryptosporidium*. Il pourrait être envisageable que ces données génotypiques et phénotypiques soient complétées par des propriétés physiques telles que les propriétés diélectrophorétiques. Cette approche serait très intéressante si elle permettait de séparer des espèces comme *C. hominis* et *C. parvum* qui ne présentent pas de différences morphologiques.

Cette différenciation n'est pas possible à la lumière des expériences effectuées (chapitre 4, section 4.4). Cependant elle aurait été un atout majeur pour comprendre le rôle respectif de ces deux espèces dans le développement de certaines Cryptosporidioses humaines.

Annexe B : Matériel et méthode pour la culture cellulaire

Pour les tests d'infestation trois lignées cellulaires ont été employées. Le protocole utilisé est dérivé de celui publié par Arrowood [Arrowood, 2002]. Les lignées cellulaires sont issues d'une banque européenne de cellules (European Collection of Cell Culture : ECACC).

Les cellules de rein de Cocker (Madin, Darby Canine Kidney : MDCK), des cellules issues de d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2) et des cellules issues d'adénocarcinome Iléocæcal humain (HCT-8) ont été sélectionnées pour leur aptitude préalablement décrite à supporter le développement partiel des parasites du genre *Cryptosporidium*.

L'acide sialique est un récepteur pour les parasites du genre *Cryptosporidium*. De ce fait, une lignée de cellules MDCK transfectées de façon stable afin de surexprimer le gène codant pour la 2,6 sialtransferase a également été testée. Les cellules de cette lignée (MDCK-siat1, ECACC 05071502) présentent sur leur membrane une augmentation du nombre de molécules d'acide sialique liées en 6 et une diminution du nombre de molécules d'acide sialique liées en 3.

B.1 Condition de culture

Les cellules HCT-8 sont cultivées dans du milieu RPMI1640 complémenté avec 2mM L glutamine, 1mM de pyruvate de Sodium, et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté. Les cellules MDCK et Caco2 sont cultivées dans du milieu de Dulbecco modifié (DMEM) complété avec 2mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté. Les cellules MDCK-siat1 sont cultivées dans du DMEM complété avec 2mM de L-glutamine, 1mg/ml de Généticine® (G418) et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté.

Pour limiter les risques de prolifération fongique et bactérienne, les milieux sont complétés avec 100U/ml de Pénicilline, 100µg/ml Streptomycine et 100µg/ml de Gentamycine.

L'ensemble des cultures cellulaires s'effectue à 37°C dans une étuve sous 5% de CO₂ et dans une atmosphère saturée en eau.

Les cellules sont repiquées toutes les semaines au 1/40^{ième} pour les MDCK siat1 au 1/20^{ième} pour les HCT-8 et les MDCK et au 1/3 pour les Caco2 dans des boites de Culture de 75cm². A 80% de confluence, les cellules sont repiquées. Après aspiration du milieu, les cellules MDCK, les MDCK siat1 et les Caco2 sont mises en incubation dans un mélange Trypsine EDTA (0.25%) à 37°C pendant 5min. Les cellules HCT-8 sont incubées avec de la splitase® (Autogen Bioclear UK) ; pendant 10 min à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées par une centrifugation de 3 min à 150xg. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans 10ml de milieu de culture préalablement chauffé à 37°C.

Les cellules sont finalement diluées dans de nouvelles boites de cultures.

B.2 Congélation/décongélation des cellules

Les flacons de culture parvenus à 80% de confluence sont traités selon les mêmes conditions qu'un repiquage, toutefois, après la centrifugation visant à éliminer le milieu de culture, le culot cellulaire est remis en suspension dans un mélange constitué de 90% de sérum de veau fœtal et 10% de DiMethylSulfoxide (DMSO). Les cellules conditionnées en ampoule de congélation de 1mL sont placées en conteneur de refroidissement (Nalgene®) contenant de l'isopropanol une nuit à -80°C. Les ampoules ainsi congelées sont alors conservées dans de l'azote liquide en cryobanque.

La décongélation s'effectue rapidement dans un bain marie à 37°C. Les ampoules sont directement replacées dans un flacon de culture de 75cm² contenant 20ml de milieu de culture. Après une nuit pour laisser les cellules adhérer, le milieu est changé pour éliminer les traces de la solution de congélation.

Bibliographie de l'annexe

- [Arrowood, 2002] Arrowood, M. J. (2002). In vitro cultivation of cryptosporidium species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3), 390–400.
- [Bern et al., 2002] Bern, C., Ortega, Y., Checkley, W., Roberts, J. M., Lescano, A. G., Cabrera, L., Verastegui, M., Black, R. E., Sterling, C., & Gilman, R. H. (2002). Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in peruvian children. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 581–585.
- [Bushen et al., 2007] Bushen, O. Y., Kohli, A., Pinkerton, R. C., Dupnik, K., Newman, R. D., Sears, C. L., Fayer, R., Lima, A. A., & Guerrant, R. L. (2007). Heavy cryptosporidial infections in children in northeast brazil: comparison of cryptosporidium hominis and cryptosporidium parvum. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 378–384.
- [Cox, 2001] Cox, F. E. G. (2001). *Parasitology - Concomitant Infections*. Cambridge University Press.
- [Fayer et al., 2005] Fayer, R., Santín, M., & Xiao, L. (2005). Cryptosporidium bovis n. sp. (apicomplexa: cryptosporidiidae) in cattle (bos taurus). *Journal of Parasitology*, 91(3), 624–629.
- [Feng et al., 2007] Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., & Xiao, L. (2007). Wide geographic distribution of cryptosporidium bovis and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), 1–9.
- [Flanigan et al., 1992] Flanigan, T., Whalen, C., Turner, J., Soave, R., Toerner, J., Havlir, D., & Kotler, D. (1992). Cryptosporidium infection and cd4 counts. *Annals of Internal Medicine*, 116, 840–842.
- [Follet et al., 2011] Follet, J., Guyot, K., Leruste, H., Follet-Dumoulin, A., Hammouma-Ghelboun, O., Certad, G., Dei-Cas, E., & Halama, P. (2011). Cryptosporidium infection in a veal calf cohort in france: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research*, 42(1), 116.
- [Payne et al., 2009] Payne, R. J., Turner, L., & Morgan, E. R. (2009). Inappropriate measures of population health for parasitic disease. *Trends in Parasitology*, 25(9), 393–395.

[Santín et al., 2007] Santín, M., Trout, J. M., & Fayer, R. (2007). Prevalence and molecular characterization of cryptosporidium and giardia species and genotypes in sheep in maryland. *Veterinary Parasitology*, 146(1-2), 17–24.

[Thompson & Smith, 2011] Thompson, R. & Smith, A. (2011). Zoonotic enteric protozoa. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 70–78.

[Xiao et al., 2001] Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H., & Lal, A. A. (2001). Identification of 5 types of cryptosporidium parasites in children in lima, peru. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 492–497.

Résumé

Ce travail de recherche porte sur le développement d'une plateforme microfluidique de type laboratoire sur puce pour la mesure du pouvoir infectieux d'agents pathogènes présents dans l'eau. La principale fonction étudiée dans ce manuscrit est la concentration de parasites en suspension dans un liquide. La manipulation des microparticules est basée sur l'emploi de forces électrocinétiques. Une analyse numérique en deux et trois dimensions apporte des informations qualitatives. Elle permet également d'extraire les valeurs géométriques clés des électrodes employées pour la concentration des microparticules. Ces premiers résultats théoriques sont confirmés expérimentalement à l'aide de deux dispositifs contenant une grande variété de concentrateurs. A partir des éléments théoriques et expérimentaux, nous concevons un concentrateur optimisé. Il est intégré dans un dispositif employant la technique de déplacement de goutte par électromouillage sur diélectrique (EWOD). Ce système est employé selon trois modes : concentrateur, extracteur et séparateur. Des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia lamblia* sont utilisés pour la caractérisation du dispositif. Enfin, des résultats préliminaires de cultures cellulaires sur des surfaces fonctionnalisées à l'échelle de la centaine de micromètres permettent d'envisager le développement d'une plateforme microfluidique complète d'analyse du pouvoir infectieux d'agents pathogènes du genre *Cryptosporidium*.

Abstract

This work focuses on the development of a microfluidic platform (lab on a chip) for the measurement of pathogens infectivity in water. The main function studied in this manuscript is the concentration of parasites suspended in a liquid. The manipulation of microparticles is based on the use of electrokinetic forces. Numerical analysis in two and three dimensions provides qualitative information. It can also extract the geometric key values of electrodes used for the concentration of the microparticles. These theoretical results are confirmed experimentally using two devices containing a wide variety of concentrators. From the theoretical and experimental results, we design an optimized concentrator. It is integrated in a system allowing droplet motion by electrowetting on dielectric (EWOD). This system is used in three modes: concentrator, extractor and separator. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia lamblia* cysts are used for the characterization of the device. Preliminary results of cell culture on surfaces functionalized at scale of hundreds of microns allow to consider the development of a complete microfluidic platform for infectivity analysis of pathogenic agent such as *Cryptosporidium*.