



HAL
open science

Cultures multi-parallélisées en millifluidique digitale : diversité et sélection artificielle

Jean-Baptiste Dupin

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Dupin. Cultures multi-parallélisées en millifluidique digitale : diversité et sélection artificielle. Chimie analytique. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS127 . tel-02329818

HAL Id: tel-02329818

<https://theses.hal.science/tel-02329818>

Submitted on 23 Oct 2019

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

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

Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre

Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés

Sujet de thèse :

**Cultures multi-parallélisées en millifluidique digitale :
diversité et sélection artificielle**

Présentée par :

Jean-Baptiste Dupin

Soutenue le 15 juin 2018

Devant le Jury composé de :

M. Jean-Marie François	Rapporteur
M. Pascal Panizza	Rapporteur
Mme Valérie Pichon	Présidente du Jury
Mme Silvia De Monte	Examinatrice
M. Hicham Ferhout	Invité
M. Jérôme Bibette	Directeur de thèse
M. Jean Baudry	Co-encadrant

Remerciements

Un long chemin a été parcouru pendant ces trois ans et demi de thèse au Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés et je souhaite ici remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de mes recherches, qui m'ont conseillé et entouré au laboratoire comme en dehors.

Je remercie tout d'abord Jérôme Bibette pour m'avoir accueilli au LCMD sur un sujet, certes risqué, mais qui me motivait énormément. En tant que directeur de thèse, il a su me guider dans les directions que devaient prendre ma thèse tout en me laissant une très grande autonomie. Son accompagnement bienveillant et sa confiance m'ont laissé apprécier les avancées concluantes des travaux et m'ont ainsi fait progresser dans ma réflexion scientifique. Je tiens aussi à remercier Jean Baudry et Nicolas Bremond de qui le suivi continu et les échanges autour de la biologie, de l'instrumentation et de l'hydrodynamique m'ont été très profitables.

Je remercie ensuite chacun des membres du jury de ma soutenance de thèse pour leur lecture critique et l'appréciation précieuse qu'ils ont porté sur ce travail mêlant physico-chimie, théorie de l'évolution et microbiologie : Valérie Pichon pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury, Jean-Marie François et Pascal Panizza pour avoir accepté la tâche d'être rapporteurs, et enfin Silvia De Monte et Hicham Ferhout pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je remercie Florence Condamine, technicienne au LCMD, dont le travail rythme celui du laboratoire et dont la disponibilité, la prévenance et l'organisation efficace sont des atouts certains pour l'équipe. Je remercie également Ankur Chaurasia, post-doctorant venu développer avec moi, lors de la seconde moitié de ma thèse, la technologie dont elle est l'aboutissement. Je remercie aussi Wilfried Sire, doctorant venu compléter notre duo sur le sujet pendant la rédaction de ce manuscrit. Pour leur accompagnement, leur soutien technologique et leurs conseils, je remercie Denis Cottinet, Jairo Garnica Rodriguez et Laurent Boitard, qui ont su m'accorder de leur temps avant de se dédier au lancement de la start-up Millidrop.

Pour leurs discussions intéressantes et leur aide sur les questions d'évolution microbiologique, je remercie les membres du groupe de laboratoire financé par le HSFP autour de ces thématiques. Je pense notamment à Arjan de Visser, à Paul Rainey et aux membres du laboratoire Génétique de l'Evolution tels que Maxime et Guilhem. Je remercie d'ailleurs les stagiaires qui ont ponctuellement pu m'aider au développement de la technologie millifluidique : Victoria Vilchez, Théo Martel et Alexis Barthet.

Je remercie les différentes personnes que j'ai pu rencontrer et côtoyer au LCMD. Je pense à Isabelle et Hélène qui facilitèrent considérablement nos démarches administratives. Je pense à Klaus et Sylvie qui partagèrent avec moi leur bureau. Je pense aux différents autres doctorants qui vécurent au laboratoire durant ma thèse : Fanny, Hugo, Perrine, Julie, Rory, Léopold, Anna, Edouard, Mathieu, Abdulwahed, Erwan, Wafa, Pablo, Aurore, Bettina, Léo et Arthur. Je pense aussi aux différentes

personnes, post-doctorants, startuppeurs, stagiaires, ingénieurs qui animèrent la vie du laboratoire : Lianmei, Annette, Ladislav, Koceila, Gabriel, Krzystof, Hojjat, Andrzej, Moshen, Coralie, Marie, Abdelfateh, Todor, Alicia, Asma, Karima, Ludivine, Jamie, Damien, Bernard, Gwenaëlle, Noushin, Eren, Joaquim, Mira, Magda, Millie, Guilhem, Amandine, Jérôme, et Florence A. Merci à tous !

Je remercie tous mes amis de l'ESPCI et mes amis parisiens qui ont su me soutenir pendant cette période intense. Je remercie enfin mes parents, mes grands-parents et mes deux sœurs pour leur soutien indéfectible depuis 28 ans.

Sommaire

Remerciements.....	3
Sommaire	5
Introduction	9
I Compréhension et gestion de la diversité.....	13
I.1 Théorie de l'évolution, sélection naturelle des populations.....	13
I.1.A Histoire de l'idée d'évolution : la question de la diversité du vivant.....	13
I.1.A.1 Des origines à l'acceptation de la question de l'évolution	13
I.1.A.2 La théorie de Lamarck et les conditions de l'évolution.....	15
I.1.A.3 Darwin et la Sélection naturelle.....	16
I.1.A.4 Vers une théorie synthétique de l'évolution.....	17
I.1.A.5 Dernières découvertes et relativité de la théorie synthétique de l'évolution.....	18
I.1.B Les Clefs de l'évolution.....	19
I.1.B.1 La dérive génétique	19
I.1.B.1.1 L'effet fondateur.....	20
I.1.B.1.2 L'effet d'étranglement.....	20
I.1.B.1.3 La diversité spécifique	21
I.1.B.1.4 Diminution systématique de la diversité : Théorie neutre de l'évolution et de la coalescence	22
I.1.B.2 Fécondation non aléatoire	23
I.1.B.3 Le flux génique	23
I.1.B.4 Les sources de diversité : notion de mutation	25
I.1.B.5 La sélection.....	27
I.1.B.5.1 Un facteur de l'évolution.....	27
I.1.B.5.2 Impact sur la diversité.....	28
I.1.B.5.3 Formes de sélection	29
I.1.B.5.4 Compétition entre sélection naturelle et sélection aléatoire	29
I.1.B.5.5 La sélection artificielle	30
I.1.B.6 La diversité en question.....	31
I.2 Microbiologie et évolution.....	32
I.2.A Présentation de <i>Escherichia coli</i>	32
I.2.A.1 Les bactéries	32
I.2.A.2 Cycle cellulaire bactérien	34
I.2.A.3 <i>E. coli</i> , modèle de laboratoire.....	34
I.2.B L'adaptabilité de <i>E. coli</i>	35
I.2.B.1 Valeur sélective (fitness).....	35
I.2.B.2 Variabilité et diversifications : du bruit non héritable aux mutations génétiques	37
I.2.B.3 Evolution microbiologique en laboratoire	38
I.2.C Stress antibiotique.....	41
I.2.C.1 Action des antibiotiques	41
I.2.C.2 La mesure de l'efficacité d'un antibiotique.....	42
I.2.C.3 Antibiotiques et évolution expérimentale.....	43
I.2.C.4 Les Aminosides : la Kanamycine et la Gentamicine.....	44
I.3 Approches théoriques de la sélection artificielle et de la gestion de la diversité.....	46
I.3.A Sélections sur les populations	46
I.3.B Gestion de la diversité et sélection intra-population.....	50

I.3.C	Sélection	51
II	Culture de communautés de micro-organismes	55
II.1	Technologies de cultures	55
II.1.A	Matrices de culture	56
II.1.B	Compartimentation en voie liquide	57
II.1.B.1	Macro-réacteurs	58
II.1.B.2	Eprouvettes	59
II.1.B.3	Plaques multi-puits	59
II.1.B.4	Millifluidique	60
II.1.B.5	Microfluidique	61
III.1.C	Une technologie pour l'évolution des populations	62
II.2	La boîte à outils millifluidique : état de l'art	64
II.2.A	Manipulation des réacteurs	65
II.2.A.1	Indépendance des réacteurs	67
II.2.A.2	Traçabilité des réacteurs	68
II.2.A.3	Mouvement d'un train de gouttes	69
II.2.A.4	Mélange dans les réacteurs	71
II.2.A.5	Effet de la gravité	72
II.2.B	Génération d'un train	72
II.2.B.1	Jonction T	73
II.2.B.2	Jonction X	74
II.2.B.3	Fragmentation de gouttes prélevées sur plaque multi-puits	75
II.2.C	Mesure durant l'incubation	76
II.2.C.1	Fluorescence dans les bioréacteurs	76
II.2.C.2	Mesure de fluorescence	77
II.2.C.3	Acquisition du signal de fluorescence	78
II.2.D	Tri et récupération des bioréacteurs	79
II.3	Augmentation de la diversité manipulable en millifluidique	81
II.3.A	Diversité inter-gouttes	81
II.3.B	Diversité interne aux gouttes	83
II.3.B.1	Diamètre du tuyau	83
II.3.B.2	Analyse des données	85
II.3.B.3	Transfert en série	85
II.4	Conclusion	86
III	Echanges entre populations	89
III.1	Phénomènes de transport entre gouttes	89
III.1.A	Objectifs	89
III.1.B	Transferts en millifluidique	90
III.1.C	Méthode expérimentale	93
III.2	Contaminations lors de la préparation	96
III.2.A	Remplissage d'une plaque multi-puits	96
III.2.B	Génération d'un train de gouttes	100
III.2.B.1	Lubrification	102
III.2.B.2	Nature du matériau du tuyau	106
III.2.B.3	Etirement de l'extrémité du tuyau	106
III.2.C	Traversée d'une jonction entre deux tuyaux	107
III.2.C.1	Nature du matériau du tuyau	108
III.2.C.2	Impact du train	109

III.3	Contaminations durant le mouvement du train	111
III.3.A	Transport d'un train de gouttes durant la génération.....	111
III.3.B	Portée des transferts pendant l'incubation.....	113
III.3.C	Origine des transferts	115
III.3.D	Application	119
III.4	Conclusion.....	120
IV	Mise en évidence d'une forme de diversité.....	123
IV.1	Imposer un stress discriminant : la résistance à un antibiotique	124
IV.1.A	Croissance à faible inoculum.....	124
IV.1.B	Effet de la taille de l'inoculum.....	127
IV.1.C	Test de fluctuation	129
IV.2	Contrôle de la coalescence.....	131
IV.2.A	Diminution continue de la taille des séparateurs	131
IV.2.B	Déclenchement de la fusion	133
IV.2.C	Concentration des gouttes fusionnées	133
IV.3	Expériences et résultats	135
IV.3.A	Protocole	135
IV.3.B	Fluctuation des croissances.....	136
IV.3.C	Evaluation des mutations.....	139
IV.3.D	Limitation de la méthode.....	141
IV.4	Conclusion.....	143
V	Une Nouvelle approche technologique pour l'évolution dirigée.....	147
V.1	Module de transfert.....	148
V.1.A	Transfert entre deux trains de gouttes.....	148
V.1.B	Une vanne microfluidique	150
V.2	Un instrument pour le transfert en série	154
V.3	Applications	158
V.3.A	Diversité des milieux de cultures	158
V.3.B	Diversité de réponses des populations à un stress	160
V.5	Conclusion.....	162
	Conclusion générale.....	163
	Annexes.....	165
	Annexe 1 : Compléments sur deux effets de la dérive génétique	166
	Théorie des glissements d'équilibre.....	166
	Paradoxe de la dérive génétique : L'effet de Yule-Simpson	166
	Annexe 2 Compléments sur les Contaminations chimiques	167
	Impact des paramètres de génération complémentaires	167
	Passage au travers d'une jonction : V_{se} pour $n > 1$	167
	Bibliographie	169

Introduction

Si l'on blâme régulièrement les micro-organismes pour leurs effets néfastes sur la santé humaine, il est désormais bien acquis que nombre d'entre eux sont utiles à notre espèce, pour la production de fromages, de vins, d'enzymes, d'antibiotiques ou encore de vaccins. Mais c'est encore sous-estimer leur importance. Les découvertes récentes, s'appuyant sur les développements de la microbiologie et des techniques de séquençage à haut débit, commencent à lever le voile qui cachait cette forêt du vivant. C'est en effet une extraordinaire diversité qui se révèle chaque jour, une diversité tant génétique que fonctionnelle.

Leur rôle se révèle effectivement essentiel dans l'évolution du vivant et des écosystèmes. Quand nous parlons aujourd'hui de bactéries, nous ne pouvons plus les comprendre comme de simples organismes unicellulaires solitaires, mais comme des communautés intégrées à un système vivant qui les dépasse et avec qui elles co-évoluent. Les microbiotes, qu'il s'agisse d'un microbiote intestinal, cutané, ou encore du sol, sont tout autant d'écosystèmes complexes évoluant en s'adaptant vertueusement à la spécificité de son milieu ou de son hôte. Cette évolution permet une diversification importante des écosystèmes à toutes échelles et favorise leur résilience. Le contexte actuel de globalisation et de standardisation des espèces, des milieux, des conditions et des interactions tend à lutter contre les formes de diversité. Il diminue ainsi la résistance des écosystèmes et favorise l'émergence des opportunistes biologiques.

Si la diversité est une des clefs d'un avenir durable, elle trouve ses origines dans l'évolution des espèces, des communautés et des écosystèmes. La sélection artificielle semble être l'une des méthodes permettant de faire regagner une forme de diversité à un écosystème, de l'enrichir pour lui permettre de résister à de nouvelles conditions ou de répondre à des besoins supérieurs. Faire évoluer des communautés et non des individus présente un intérêt certain, mais aucune technologie n'en est aujourd'hui capable. Il n'existe en particulier pas de solution alliant une automatisation, une multi-parallélisation et une conservation de la diversité des populations en culture. Répondre à cet enjeu est ambitieux mais c'est ce sur quoi notre travail s'est intensivement porté durant cette thèse.

Comme nous le verrons en détail autour des questions de diversité, d'évolution et de population dans le chapitre I, ces idées d'échelle et de diversité sont en fait doubles. Ce sont deux échelles de taille d'écosystème, correspondant à deux types de diversité, qu'il nous faut pouvoir manipuler dans le cadre de l'évolution dirigée de populations de bactéries. Nous tâcherons de développer dans cette thèse une technologie qui pourrait permettre de sélectionner artificiellement des cultures parallélisées de bactéries, en accord avec les préceptes que nous aurons établis. L'objectif est ambitieux et nous avons donc souhaité

initier les premiers pas qui pourront porter cette technologie. Ces quatre premiers pas suivent un à un les quatre éléments qui conditionnent tout changement évolutif. Ces agents sont la dérive génétique, le flux génique, la diversification et la sélection.

Notre première étape fut de sélectionner la technologie la plus adaptée pour moduler la dérive génétique tout en maximisant le nombre de cultures disponibles. Nous décrivons ainsi dans le chapitre II toutes les subtilités et les avantages des systèmes millifluidiques qui nous permettent d'opérer un grand nombre de cultures en parallèle dans des conditions homogènes. Pour que ce creuset de cultures puisse répondre à nos objectifs, nous avons fait évoluer la technologie pour l'adapter à de potentielles sélections artificielles sur les populations transférées en série.

La millifluidique digitale fixe l'échantillon que nous manipulons : la goutte. Ce sont donc les échanges entre ces gouttes que nous avons étudiés et que nous décrivons dans le chapitre III. Ces échanges matérialisent en effet les flux d'individus entre ces populations, ainsi que les fuites de milieu, et peuvent affecter les mesures effectuées avec cette technologie. Tous deux tendent à uniformiser les populations des gouttes et réduisent ainsi la divergence évolutive entre les populations et donc l'émergence de diversités.

Cette émergence de diversités est l'étincelle-même de l'évolution. Si nous avons fait en sorte de nous placer dans des conditions propices à la diversification au sein des populations et entre elles, il est décisif de pouvoir la détecter afin de la sélectionner. Nous appliquerons ainsi, dans le chapitre IV, notre technologie à l'élaboration d'un protocole d'évaluation de la diversité de réponse de *E. coli* à un antibiotique, la gentamicine. Attiser artificiellement des caractères recherchés, non favorisés par la sélection naturelle et peu représentés, est tout l'enjeu de l'évolution dirigée.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous présenterons un nouveau module technologique permettant de faciliter la manipulation des gouttes en millifluidique. Il insufflera notamment de nouvelles opportunités à notre dispositif en permettant, tant une sélection artificielle sur les gouttes qu'une sélection naturelle contrôlée en leur sein. Ce dernier pas nous ouvre de nouveaux horizons et nous rapproche définitivement de notre objectif : un instrument permettant l'évolution dirigée de cultures multi-parallélisées.

Chapitre I

Compréhension et gestion de la diversité

I Compréhension et gestion de la diversité

Nous souhaitons présenter dans ce chapitre le cheminement de pensée qui a guidé notre intérêt pour la diversité des populations puis a orienté notre réflexion vers le développement d'un instrument adapté à la manipulation et à l'étude des populations de micro-organismes autour des thématiques de l'évolution.

Dans une première partie, nous détaillerons le concept de théorie de l'évolution, son histoire, son lien avec la question de la diversité du vivant, et les différents principes fondateurs de cette théorie. Nous présenterons ensuite le modèle biologique que nous avons choisi d'étudier, et enfin nous aborderons quelques approches classiques d'évolution de ce modèle biologique, et tâcherons de rationaliser et modéliser les paramètres expérimentaux pouvant affecter l'évolution.

I.1 Théorie de l'évolution, sélection naturelle des populations

I.1.A Histoire de l'idée d'évolution : la question de la diversité du vivant

Depuis toujours, l'homme s'interroge sur l'origine, la nature et la finalité de la vie ou plus généralement de l'existence, en particulier de l'existence humaine, mais aussi sur le sens de l'existence des autres êtres vivants, très tôt identifiés comme une multitude d'espèces animales bien distinctes. "Qui sommes-nous?", "D'où venons-nous?", "Où allons-nous?" sont autant de questions métaphysiques trouvant leur sens tout autant à propos de l'homme que de son environnement.

I.1.A.1 Des origines à l'acceptation de la question de l'évolution

Les hommes ont ainsi cherché dès l'antiquité à comprendre l'origine de la diversité du vivant, mais seules les idées initiées par Platon et pleinement développées par Aristote surent se fixer avec le temps car largement propagées par les religions monothéistes. L'essence même de chaque chose et de chaque être était ainsi considérée comme immuable et d'origine spirituelle, soit d'origine divine, sinon du moins intrinsèquement régie par des codes qui nous dépassent. La vision fixiste du vivant dominait donc, c'est à dire l'essentialisme, selon lequel les êtres possédaient des caractéristiques inaltérables, à l'opposé du nominalisme qui disait la classification du vivant en « espèces » suivant la vision biaisée qu'avait l'homme de la Nature. Aux grandes questions de la vie, la religion répondait alors, notamment dans les récits de la Genèse, que toutes les espèces avaient été créées telles quelles par Dieu [leur origine] selon un ordre adapté au service de l'homme [leur finalité]. Ce concept d'espèces créées harmonieusement à dessein pour remplir une fonction précise dans la Nature et y être parfaitement adaptées restera la vision de la pensée occidentale jusqu'au XVIIIème siècle, car extrêmement protégée et favorisée par un monde religieux au dogme unificateur et sélectif et au développement très actif. Pendant le Moyen Âge, le dogmatisme chrétien limitait ainsi les débats philosophiques engendrés par toute nouvelle idée novatrice pouvant remettre en cause les écrits bibliques.

Hors de la bulle occidentale, assimilée alors au monde chrétien, des pensées évolutionnistes surgissaient sporadiquement en Orient, en particulier dans le monde musulman. Le morcellement de ce monde et la forte liberté des pensées en résultant furent sa force durant le Moyen-Âge et lui permirent de développer une forte diversité de cultures et de pensées, en partie basée sur un héritage de l'Antiquité plus diversifié que celui que conserva le monde occidental [80]. Mais cette force fut aussi sa faiblesse, car la difficulté avec laquelle ces idées purent se propager dans le monde musulman et se confronter aux autres idées limita leur fixation. Les seuls écrits qui ne furent pas oubliés sont ceux qui réussirent à percer dans le monde chrétien, notamment à partir de la Renaissance. De l'analyse de la diversité du vivant dans le monde musulman, nous pourrions retenir Al-Jahiz (776-867) qui proposa une première théorie de l'évolution des espèces dans son *Livre des Animaux*, ou encore Nasir ad-Din at-Tusi (1201-1274) qui soutient l'idée de perfectionnement des espèces par la sélection des mieux adaptés à leur environnement, dans *L'Éthique de Nasir*: plus une espèce était diversifiée, plus elle avait la capacité de s'adapter ; les organismes capables d'acquiescer plus rapidement de nouvelles fonctions étaient avantagés [1].

Si la Renaissance occidentale restera hermétique à l'acceptation ou à la transmission d'idées évolutionnistes, notamment à cause de l'Inquisition qui punira sévèrement des idées comme celles de Giordano Bruno qui défendit des théories polygéniques [92], elle sera le théâtre de plusieurs révolutions qui affecteront de manière déterminante le cours de la pensée occidentale en la faisant évoluer hors de son immobilisme chrétien. Ces révolutions furent essentiellement de trois ordres : culturel, technologique et scientifique. L'assimilation du monde chrétien d'Orient par le monde musulman, l'intensification des échanges avec ce dernier et la redécouverte des auteurs antiques imposèrent une prise de recul importante au monde occidental qui prit conscience de son histoire et se remit en cause, affaiblissant le courant de pensée dogmatique dominant. Si les innovations technologiques ont participé à ces transferts de pensée et de connaissances avec l'extérieur du monde occidental, l'imprimerie permit pour la première fois d'augmenter la portée des idées et d'accroître ainsi leur nombre pouvant persister et s'affronter les uns les autres, concurrençant ainsi la dérive du monopole dogmatique, déjà ébranlé. Enfin, des idées germant et se propageant naturellement, sortit le premier courant scientifique moderne, la Révolution mécaniste, qui proposa le premier principe de sélection et d'analyse des théories sous l'angle de la cause et de l'effet, rejetant le concept de finalisme. L'idée d'évolution biologique avait ainsi en germe tous les éléments pour pouvoir évoluer vers sa forme moderne.

La vision mécanique se développa dans les sciences naturelles, lors du siècle des Lumières, à partir des sciences physiques. Les naturalistes commencèrent à s'intéresser à la variabilité des espèces et à l'hérédité tandis que la paléontologie et la géologie remettaient en cause la statique de la Nature par ses concepts d'extinction et de modification de l'environnement. Si elle n'était pas encore acceptée par tous, en particulier en France, l'idée de transformation des espèces faisait son chemin, sans soulever de réel débat, mais toujours basée sur une théorie de l'hérédité acceptée depuis Aristote : la transmission des caractères acquis. Avec des termes anachroniques pour l'époque que sont les notions de phénotype (l'ensemble des traits observables d'un organisme) et de génotype (l'ensemble des informations génétiques de l'organisme, et de manière plus large les informations transmises à la descendance), nous pourrions dire que phénotype et génotype étaient considérés comme interdépendants sinon équivalents.

I.1.A.2 La théorie de Lamarck et les conditions de l'évolution

La première théorie scientifique d'une évolution des espèces fut avancée en 1809 par Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829) dans sa *Philosophie zoologique* et eut le mérite de soulever les premiers vrais débats contre le fixisme. Ce dernier était alors réadapté sous la forme du catastrophisme, théorie supportée par Georges Cuvier prônant l'idée que l'histoire de la Terre fut ponctuée par des catastrophes « d'origines divines » éteignant certaines espèces et en créant de nouvelles, la théorie fixiste restant valable entre deux catastrophes.

Lamarck développe ainsi la théorie du transformisme basée sur deux principes justifiant la diversification des espèces :

- Les êtres vivants tendent naturellement à se complexifier graduellement mais continûment par une mécanique propre à leur métabolisme. L'accumulation progressive de ces nouveaux caractères ou "organes" prédispose ainsi les être-vivants à être de plus en plus diversifiés et à mieux pouvoir s'adapter via son second principe.
- Ce second principe qui fonde la théorie de Lamarck explique la faculté d'adaptation des êtres vivants. Les individus d'une espèce ont la capacité de faire varier par leur comportement le développement de leurs "organes" afin de répondre à un besoin. Il s'agit de la loi "d'usage et de non-usage", observation admise à l'époque. Si cette variabilité de l'individu pouvait être transférée à sa descendance, cette variabilité acquise deviendrait alors une diversité innée, et c'est ce qu'offrait justement l'idée de la transmission des caractères acquis.

Lamarck utilisa pour supporter sa théorie des exemples restés célèbres, tel l'allongement du cou de la girafe par une utilisation soutenue de celui-ci, ou l'atrophie des yeux de la taupe par non-usage.

C'est cette dernière idée qui restera abusivement et durablement ancrée au nom de Lamarck alors qu'il ne fit qu'utiliser une idée admise, ce que fera aussi Darwin, sans chercher à avancer de théorie expliquant la transmission des caractères acquis, ce que fera en revanche Darwin. Si le terme de Lamarckisme sera utilisé en opposition au terme de Darwinisme sur cette question de la transmission de l'acquis, Lamarck différera de Darwin par sa vision linéaire de l'évolution et par la nécessité de l'intention qui préside à toute évolution. Ce seront surtout les héritiers stricts de la théorie de Lamarck qui forgeront la définition moderne de Lamarckisme en cherchant en vain jusqu'au début du XXème siècle à démontrer l'hérédité des caractères acquis.

Finalement, nous devons à la théorie de Lamarck d'être la première explication scientifique moderne de la diversification biologique des espèces et de sa nécessité pour s'adapter aux variations de l'environnement, cette explication présentant deux conditions nécessaires à l'évolution : l'hérédité et la variabilité. Nous noterons aussi que cette théorie sous-entend une idée latente mais qui aura une forte répercussion sur les conjectures concernant l'évolution des populations: chaque individu d'une population soumis à une variation environnementale tend à se transformer pour s'adapter à cette variation, il y a donc conservation de la diversité préexistante de la population soumise au mécanisme d'adaptation proposé.

I.1.A.3 Darwin et la Sélection naturelle

Charles Darwin (1809-1882) prit conscience d'un élément manquant dans la théorie de Lamarck suite à principalement des observations sur la biogéographie (expédition du Beagle) et l'élevage animal (colombophilie). En étudiant ces derniers, ainsi que la morphologie, la géologie ou encore l'embryologie, il trouva de nombreuses preuves de l'évolution des espèces et apporta un nouvel élément de l'évolution, un mécanisme adaptatif, qu'il baptise sélection naturelle en opposition à la sélection artificielle des agriculteurs et éleveurs.

La sélection artificielle consiste à propager sélectivement les traits et caractères, avantageux pour le sélectionneur, d'un individu au sein d'une population. En d'autres termes, le sélectionneur évalue un caractère et affecte la capacité reproductive d'un individu en fonction de cette évaluation. Ce procédé consiste généralement à repérer la variation d'un trait (que cette variation soit préexistante et diluée dans la population ou innovante), la propager dans une population, et éliminer les traits moins efficaces peu à peu jusqu'à apparition d'une lignée « pure » (de diversité nulle). Pourtant, une lignée même "pure" semble conserver sa capacité à se diversifier, même sous sélection constante et donc sans la nécessité pour les individus de transformer leurs organes par "l'usage et le non-usage", ce qui laissait déjà penser que la source des variations entre individus n'était pas seulement régie par cette loi : un mécanisme de diversification semble opérer indépendamment des conditions de sélection imposées.

Darwin considéra ainsi que les individus variaient spontanément dans la nature, que les conditions environnementales pouvaient influencer sur la capacité reproductive de l'individu en fonction de ces variations et que la limitation de la taille d'une population d'individus allait conduire à une compétition entre individus, soit une forme de sélection conditionnée par la nature à condition que ces variations soient transmises à leur descendance. Darwin proposa ainsi le mécanisme de la sélection naturelle pour justifier la diversification adaptative des êtres vivants en 1859 dans *De l'origine des espèces* : seuls les descendants des individus les mieux adaptés parviendront à engendrer une descendance. Ce mécanisme justifie ainsi une évolution adaptative des espèces à leur environnement.

A l'instar de Lamarck, Darwin ne remettra pas en cause la transmission des caractères acquis, il proposera même l'hypothèse de pangenèse qui expliquerait cette transmission, et soumettra la sélection naturelle comme complément à la théorie de Lamarck, à une différence près : le processus de variabilité entre individus. La variabilité serait ainsi causée par les variations environnementales chez Lamarck tandis que Darwin suppose que cette variabilité est préalable aux variations, sans pour autant expliquer la source de variabilité. Si le débat sur le travail de Darwin ne fit pas pleinement accepter le mécanisme de la sélection naturelle, il permit néanmoins l'acceptation définitive du concept d'évolution, il faudra quelques avancées expliquant les mécanismes de l'hérédité et de la variabilité pour conclure que la sélection naturelle était décisive dans un processus évolutif.

I.1.A.4 Vers une théorie synthétique de l'évolution

August Weismann (1834-1914) élabore à la fin du XIX^{ème} siècle la théorie sur la continuité du plasma germinatif, où les cellules germinales (germen) et les cellules corporelles (soma) sont strictement séparées, ce qui interdisait la transmission des caractères acquis. Les décennies qui vont suivre vont voir la redécouverte des lois de Gregor Mendel (1822-1884) qui vont radicalement changer la compréhension des mécanismes de l'hérédité et donner naissance à la génétique, il était alors encore communément admis qu'un individu présentait un phénotype intermédiaire moyen de celui de ses parents. Les notions de gènes et d'allèles pouvaient expliquer l'existence d'une variabilité naturelle et pouvaient ainsi se marier favorablement au mécanisme de la sélection naturelle.

Leur étude conjointe fut l'origine de nouvelles méthodes dans l'étude de l'évolution, comme la génétique des populations qui accorda les biostatisticiens et les mendéliens autour de l'évolution non pas de l'espèce mais des gènes propres à l'espèce au sein d'une population. Un individu ne peut, en effet, pas être à lui seul l'unique dépositaire du patrimoine génétique d'une population, et ne peut statistiquement pas (chez les diploïdes) transmettre intégralement son patrimoine dans une population de taille stable. Il fallait donc se placer du point de vue du gène et la diversité du vivant devenait donc une diversité génétique : plus une population avait un patrimoine génétique riche, c'est à dire diversifié, et plus elle était susceptible de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. Ronald Fisher (1890-1962) montra ainsi en 1930 dans son ouvrage *The Genetical Theory of Natural Selection* que la sélection naturelle pouvait changer la fréquence allélique au sein d'une population, que l'action combinée de nombreux gènes pouvait expliquer les variations continues observées dans une espèce, tandis que J.B.S. Haldane (1892-1964) appliqua ces analyses statistiques à des exemples réels, comme le phalène du bouleau, et montra ainsi l'efficacité de la sélection naturelle.

Si, à l'échelle d'une population, la diversification du patrimoine pouvait se faire par le "flux génique", nouvelle notion entendant notamment les migrations entre les différentes populations d'une même espèce, aucun mécanisme n'était alors connu permettant d'accroître la diversité génétique au sein de l'espèce, cette dernière étant isolée génétiquement des autres espèces. Pourtant, cette création de nouveaux allèles ou gènes apparaissait comme nécessaire pour contrebalancer la diminution statistique du patrimoine génétique. En effet, la génétique des populations a mis en évidence l'importance de la taille d'une population sur la conservation de sa diversité, une petite population sera ainsi très sensible à la "dérive génétique", c'est à dire à un éloignement de l'état génétique initial par perte de sa diversité, tandis qu'une grande population aurait peu de chance de perdre des allèles. Sewall Wright (1889-1988), qui introduisit la théorie de la dérive génétique et de « taille effective » d'une population, proposa de plus le concept de paysage adaptatif et, en 1932, la théorie des glissements d'équilibre (*Shifting balance theory*), théorie avançant que la dérive génétique puisse être un agent positif d'adaptation sous certaines conditions.

La notion alors introduite pour justifier la création de nouveaux gènes ou allèles est la notion de mutation génétique : un allèle existant pouvait muter, c'est à dire différer de l'allèle original, sans que ni le mécanisme de mutation ni sa cause ne soient proposés. Ce complément, appuyé plus tard, entre autre par les travaux de Theodosius Dobzhansky (1900-1975), *Genetics and the Origin of Species* en 1937, qui mirent en évidence la diversité naturelle des populations sauvages à différentes échelles, faisant le lien entre micro et macroévolution, par ceux de Edmund Brisco Ford (1901-1988) sur le polymorphisme, puis par les travaux de Ernst Mayr (1904-2005) sur la définition moderne d'espèce et leur distribution géographique (notion de vicariance), put définitivement amorcer un consensus interdisciplinaire autour d'une théorie de l'évolution qui pouvait s'appliquer à l'ensemble de la biologie : la théorie synthétique de l'évolution.

Salvador Luria et Max Delbrück réalisèrent en 1943 une expérience de mesure du taux de mutations génétiques de bactéries face à un stress (des phages) et déterminèrent statistiquement (par l'évaluation de la variance du taux de mutation) si ces mutations, permettant la résistance des bactéries, étaient des événements aléatoires préalables au stress sélectif, ou si elles étaient induites par ce stress [61]. Les résultats tranchèrent en faveur d'une source de variabilité aléatoire préalable au stress, le darwinisme venait donc de l'emporter. Si la cause d'une mutation génétique se comprenait désormais, la nature n'en était pas encore claire. La découverte de l'ADN révolutionna alors la discipline en donnant une existence concrète aux notions, jusque-là abstraites, de gène et de mutation, et amorça la biologie moléculaire dont allait découler la discipline de l'évolution moléculaire. A partir des années 50, suite aux nombreuses réponses semblant clore définitivement les débats passés, la théorie synthétique de l'évolution se réduisit alors en ne considérant plus l'ADN ou l'ARN que comme l'unique support de l'hérédité, la mutation comme l'unique source de variabilité (du gène) et la sélection naturelle comme le seul mécanisme expliquant les changements évolutifs.

La dernière théorie venue apporter sa pierre à l'édifice évolutionniste et donnant une perspective différente de la diversité génétique dans les populations fut la théorie neutraliste de l'évolution, portée par Motoo Kimura (1924-1994). Cette théorie s'intéresse à la dominance supposée des mutations neutres, qui n'affectent pas la valeur reproductive de l'individu, et à la propagation de ces mutations dans une population, sans réelle compétition entre individus. Cette théorie introduisit en particulier les notions de fixation d'un gène et de coalescence, et développa ainsi l'importance de la dérive génétique face à la sélection naturelle.

I.1.A.5 Dernières découvertes et relativité de la théorie synthétique de l'évolution

La théorie synthétique de l'évolution, si elle n'est pas remise en cause par les découvertes récentes, a été néanmoins assouplie en ce qui concerne l'hérédité. L'épigénétique, le transfert horizontal, ou encore la symbiogenèse renforcent notre certitude de la complexité de l'évolution. L'épigénétique nous offre ainsi un continuum entre variation de l'individu et diversification de sa lignée, le transfert horizontal ouvre d'autres voies de transferts géniques qui peuvent être inter-espèces, enfin la symbiogenèse nous invite à mieux saisir les questions de coévolution ou d'évolution en interaction avec son écosystème. Ces dernières découvertes nous poussent donc à rester humbles devant la complexité de la diversification du vivant.

I.1.B Les Clefs de l'évolution

La riche histoire de l'idée d'évolution biologique a montré la volonté des chercheurs à vouloir abstraire les notions impliquées dans tout phénomène évolutif sous forme de lois généralisables. Ce sont ces lois, ou plutôt ces facteurs de changements évolutifs dont nous traiterons dans cette partie.

Afin de déterminer quels sont les facteurs qui peuvent faire évoluer une population, c'est à dire affecter sa diversité, ou la fréquence de ses génotypes/phénotypes, le plus simple serait de se demander sous quelles conditions cette population n'évolue pas. G. H. Hardy et W. Weinberg se sont ainsi intéressés à la question de la persistance des variations génétiques et phénotypiques dans une population diploïde en se fondant sur les lois de Mendel. Ils ont ainsi trouvé que les proportions initiales des génotypes dans une population resteront constantes tant que les conditions suivantes seront satisfaites :

- **La taille de la population est très grande**
- **Les fécondations sont aléatoires**
- **Aucun gène ne provient d'en dehors de la population**
- **Aucune mutation ne survient**
- **Aucune sélection n'est imposée.**

Sous de telles conditions, les génotypes sont dits en équilibre de « Hardy-Weinberg ». Dans un sens, ces conditions peuvent être interprétées comme une forme de « bilan de diversité » : une grande taille de la population, qui assure une faible dérive génétique est une hypothèse de continuité de l'observable, le caractère aléatoire des fécondations assure l'absence de biais entre le phénotype (la mesure) et la diversité, le flux génique et les mutations précisent l'apport et la création de nouveaux allèles, tandis que la sélection désigne la perte sélective mais adaptative de diversité.

Nous expliciterons ces facteurs, en suivant le point de vue adopté usuellement dans leur description, c'est à dire dans le cas classique d'organismes diploïdes, mais les notions abordées n'y sont pas pour autant limitées, sauf précisé. Il est aussi bon de rappeler que même s'il sera essentiellement question d'individus dans une population comme les éléments pouvant évoluer, différentes échelles du vivant (et du non-vivant) peuvent être aussi soumises à l'évolution et à ces facteurs, que ce soit un gène, une cellule, un organisme, une communauté, une population, un écosystème, etc.

I.1.B.1 La dérive génétique

Introduit par Mayr [72], cet agent de changement évolutif caractérise l'évolution d'une population causée par des phénomènes stochastiques, c'est la modification de la distribution des allèles ou des génotypes au sein de la population indépendamment de tout autre facteur. Cette dérive est toujours imputable à la faible taille d'une population ou d'une sous-population d'un génotype particulier à un moment de son histoire évolutive. En effet, un petit échantillon d'une population est peu représentatif de l'ensemble de la population. Ainsi, une population soudainement divisée en petites populations isolées est sensible à la dérive génétique et chacune de ses sous-populations va diverger statistiquement de la population initiale.

I.1.B.1.1 L'effet fondateur

Lorsqu'un petit groupe d'individus est isolé d'une population, du moins pour la reproduction, pour en former une nouvelle, celle-ci est sensible à la dérive génétique dès sa création, c'est l'effet « fondateur » [89] : la diversité de la population nouvellement créée est plus fortement liée à celle du petit groupe fondateur qu'à celle de la population initiale. Plus la population initiale sera diversifiée initialement, plus la population de colons devrait être grande pour être fidèle à la population de départ et donc plus il sera difficile pour la colonie de ne pas diverger de cette dernière.

Si la population pionnière manifeste une perte de diversité significative, cette perturbation de la distribution de la diversité peut accroître la fréquence de certains allèles normalement rares, même si ces derniers représentent un handicap adaptatif. Les populations de l'Amérique du Nord issues des premières vagues de colons qui se sont peu mélangés par la suite aux autres populations (Québec, Amish) possèdent ainsi un grand nombre d'individus présentant des anomalies génétiques (polydactylie, syndrome d'Andermann) rarissimes dans le reste du monde. Un des colons de la petite colonie ancestrale devait présenter un gène relatif à une de ces anomalies et l'a transmis jusqu'à aujourd'hui.

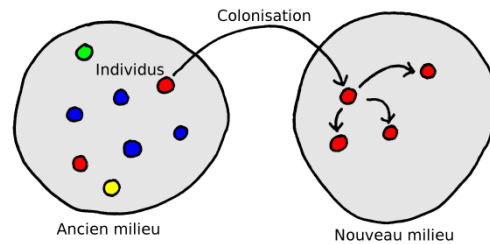


Figure I-1 : Illustration de l'effet fondateur. Un individu, issu d'une population et tiré au hasard, va coloniser un nouveau milieu et s'y multiplier. La nouvelle population sera représentative du colon et non de la population d'origine du colon.

I.1.B.1.2 L'effet d'étranglement

Un goulot d'étranglement génétique est un événement impliquant définitivement l'absence de reproduction d'une partie significative d'une population [14], il est donc associé à une perte de la diversité de cette population. Cet effet, d'autant plus s'il est prolongé, peut profiter aux allèles survivants en augmentant leur chance de fixation, mais aussi conduire la population à l'extinction.

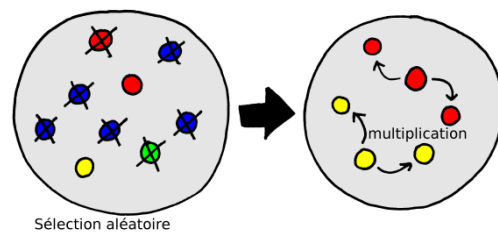


Figure I-2 : Illustration de l'effet d'étranglement. Un stress a aléatoirement anéanti une partie de la population. Les survivants ne sont pas représentatifs de la population ancestrale

Cet effet arrive assez souvent au cours de l'évolution des populations, il suffit que la population soit brusquement réduite de manière peu sélective, voire non sélective, à cause d'une catastrophe naturelle par exemple. De nombreux exemples manifestent cet effet d'étranglement dans le monde animal, par exemple la chasse intensive du castor européen [30] ou des éléphants de mer [47] a considérablement réduit leur population (quelques dizaines d'individus au début du XX^{ème} siècle). Même si leur population augmente à nouveau avec l'aide de l'homme, la majorité de leur richesse génétique a été perdue, la consanguinité y est très forte et l'espèce demeure donc toujours très faible et menacée.

Dans une certaine mesure, nous pouvons aussi considérer qu'une population passe par un goulot d'étranglement si elle est soumise à une pression de sélection très forte, par exemple sur un seul critère phénotypique, ce qui va diminuer aléatoirement la diversité génétique du génotype indépendamment du critère de sélection. Ceci est largement observé en élevage où la sélection artificielle continue d'un trait

particulier (en utilisant notamment un faible pool de mâles reproducteurs) va faire dériver génétiquement les autres traits de la population. Plusieurs races d'élevage se sont ainsi éteintes, ont accumulé des caractères délétères ou ont perdu leur capacité à s'adapter à de nouveaux stress de sélection [90].

I.1.B.1.3 La diversité spécifique

On considère aujourd'hui qu'une diversité minimale d'une population est nécessaire à sa survie, la diversité « intra-spécifique », la diversité génétique propre à l'espèce, est donc, avec la diversité des espèces, l'un des aspects majeurs de la biodiversité. Le caractère multi-paramètres de la diversité permet de complexifier l'approche que l'on peut avoir des écosystèmes [49]. L'appauvrissement en l'une de ces deux diversités conduit inexorablement à une perte amplifiée de la diversité biologique et à une plus forte vulnérabilité de l'écosystème face à de nouvelles conditions sélectives ou à l'arrivée d'un envahisseur. On dit que la résilience écologique, c'est à dire la capacité d'un écosystème, d'une population, d'une espèce à s'adapter à une forte perturbation pour revenir à un équilibre écologique, diminue.

Le morcellement de l'habitat est aujourd'hui l'un des principaux facteurs de diminution de la diversité spécifique : les populations, isolées en sous-populations trop petites, perdent leur diversité spécifique et souffrent de consanguinité (dans le cas d'une population structurée en plusieurs sous-populations, nous parlerons de « métapopulation »). L'ensemble des sous-populations additionnées peut présenter la même diversité que la population ancestrale, mais comme chaque sous-population est beaucoup plus soumise à la dérive génétique que la population ancestrale, leur diversité devrait diverger :

- Si une sous-population est suffisamment grande, la population restera stable et divergera génétiquement des autres sous-populations, Il y a donc augmentation de la diversité spécifique jusqu'à spéciation des sous-populations, c'est à dire jusqu'au moment où les populations ne pourront plus être rassemblées.
- Les sous-populations plus petites que la « population minimum viable » (MVP) finiront par s'éteindre [41].

Plusieurs études ont mesuré la diversité génétique des populations en fonction de leur taille [11] (figure I-3). Généralement, cette diversité varie logarithmiquement avec la taille de la population.

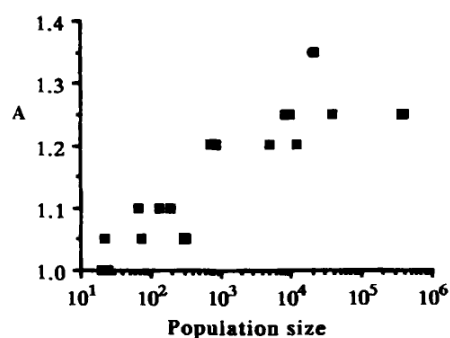


Figure I-3 : Variation logarithmique du nombre moyen d'allèles par gène en fonction de la taille de la population chez *Halocarpus bidwillii* [11].

Contrairement à ce que l'on pensait autrefois, la diversité spécifique n'est pas directement liée à la diversité des espèces, au contraire il a été observé que les zones géographiques présentant une grande diversité d'espèces (les forêts équatoriales par exemple) présentaient une faible diversité spécifique en moyenne, tandis qu'au contraire des zones reconnues comme faibles en espèces (régions nordiques) se sont révélés présenter une diversité spécifique très riche. Afin d'appréhender la diversité biologique d'un écosystème, il faut donc pouvoir cerner sa diversité d'espèces et leurs diversités spécifiques respectives [19].

I.1.B.1.4 Diminution systématique de la diversité : Théorie neutre de l'évolution et de la coalescence

Nous avons vu que la dérive génétique altère la diversité biologique lorsqu'une population est diminuée jusqu'à une petite taille, mais si son effet est drastique dans ce cas, il n'en reste pas moins important quel que soit l'état de la population. En effet, une population étant naturellement limitée en taille, tous les individus de la population ne pourront pas transmettre l'intégralité de leur génotype à la génération suivante ; ainsi, même une grande population de taille constante verra sa diversité diminuer au cours du temps.

Un modèle simple permettant d'expliquer ce phénomène serait d'imaginer une population dont les N individus tendent à se dupliquer à chaque génération, le nombre d'individus devrait donc doubler à chaque génération, pourtant la taille de la population devrait rester constante. Parmi les $2N$ individus de la nouvelle génération, il faut donc en sélectionner aléatoirement N . Il est très improbable de sélectionner exactement un descendant pour chaque individu de la population initiale et donc certains individus n'auront pas de descendant. On simplifiera généralement ce modèle, afin de mieux manifester la taille constante de la population en considérant directement que chaque individu de la population initiale aura deux, un ou aucun descendant [73].

Cette perte constante de diversité a une implication importante : tout allèle est amené statistiquement à disparaître. En remontant suffisamment loin dans l'histoire génétique d'une population, et en suivant un gène particulier, nous arriverons nécessairement à un moment dans le temps où, de tous les allèles existants alors de ce gène, un seul s'est transmis jusqu'à aujourd'hui. En d'autres termes, il existe pour chaque gène un allèle ancestral dont serait issus tous les allèles actuels. Chez l'homme, par exemple, nous parlons de l'Eve et l'Adam génétique, les plus récents ancêtres communs des chromosomes Y et des ADN mitochondriaux [3].

Ce constat est à la base de la théorie de la coalescence dont le but est de suivre l'évolution des allèles d'un gène donné au sein de toute une population jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent de ces allèles. Cette théorie s'opère sous certaines hypothèses : pas de sélection, ni de flux génique, ni de structuration de la population ni de recombinaison. Il y a ce que l'on appelle « coalescence » lorsque deux lignés alléliques se rejoignent. L'intérêt de cette théorie est d'évaluer théoriquement certaines informations descriptives de la diversité d'un gène dans une population comme le temps de coalescence (c'est à dire le nombre moyen de générations qui nous séparent de l'ancêtre commun le plus récent) ou encore la taille de sa généalogie (c'est à dire la somme des généalogies respectives de chaque allèle, son patrimoine). Cette dernière notion se révélera critique dans l'émergence de la diversité.

Afin de décrire la diversité spécifique d'un gène dans une population, le terme de « taille effective d'une population » a été introduit, il définit actuellement la taille d'une population « idéale » de Wright-Fisher où la dérive génétique aurait la même intensité que dans la population qui nous intéresse. Cette taille effective est donc utilisée pour décrire simplement la diversité d'une population et la modéliser. Dans la théorie neutre de l'évolution (dans laquelle s'inscrit la théorie de la coalescence), excepté l'idée d'une taille effective minimale de population viable, une autre taille critique est prise en compte : la « taille effective sélective » d'une population, c'est à dire la taille limite entre un régime où la dérive génétique est importante (cas neutre) et un régime où la valeur sélective d'un individu peut l'emporter.

Cette courte introduction à la question de la dérive génétique dans les populations (des effets sont décrits en complément en annexe 1) nous a permis de montrer à quel point sa compréhension et sa manipulation sont délicates, de par ses effets tantôt néfastes (diminution de la diversité d'une population), tantôt bénéfiques (diversification d'une métapopulation), ou relatifs (modération de la sélection naturelle). Il s'agit donc d'un facteur important à prendre en compte dans toute expérience sur l'évolution ou de sélection artificielle, notamment parce qu'il est lié à nos conditions expérimentales. L'étude de la dérive génétique, appliqué au modèle biologique que nous avons choisi, sera menée dans la dernière partie de ce chapitre. Puis nous sélectionnerons et concevrons dans le chapitre II un dispositif expérimental répondant aux questions soulevées par les problématiques concernant la dérive génétique.

I.1.B.2 Fécondation non aléatoire

Au sein d'une population, si certains individus se reproduisent statistiquement plus avec certains individus présentant un caractère particulier (phénotypique, comportemental, environnemental, etc.), alors la fécondation ne peut plus être considérée comme aléatoire dans la population. De ce point de vue, la fécondation non aléatoire ne concerne que les eucaryotes diploïdes et ne s'applique pas aux organismes étudiés en microbiologie ; en effet, elle affecte essentiellement la distribution phénotypique d'une population polymorphe d'individus sexués en écartant la population de l'équilibre de « Hardy-Weinberg », et affecte essentiellement la proportion d'hétérozygotes et d'homozygotes.

A l'échelle d'une population, cette notion manifeste une structuration de la population et donc qu'il s'agit d'une métapopulation (chaque individu d'une sous-population préfère se reproduire avec les individus de sa sous-population). Si la reproduction peut être vue pour l'individu comme le brassage des gènes (dans une moindre mesure, pour les micro-organismes, l'échange de gènes via le transfert horizontal), celle-ci peut être vue pour les sous-populations comme l'échange d'individus. L'échange non aléatoire d'individus entre sous-populations (c'est-à-dire une forme d'appariement reproducteur entre populations) révèle la structuration de la métapopulation et le « flux génique » entre sous-populations.

I.1.B.3 Le flux génique

Le transport de gènes entre deux « réservoirs de gènes » est ce que l'on appelle le « flux génique ». La nature de ce transport est conditionnée par la nature du réservoir des individus d'une même espèce qui se reproduisent, des individus provenant d'une espèce différente peuvent se transférer des gènes (transfert horizontal des bactéries, acquisition de gènes viraux) ou leur devenir et donc leurs génomes (relation symbiotique, parasitisme, mutualisme, commensalisme), des populations peuvent échanger des individus ou des groupes d'individus (migrations, exogamie), des écosystèmes peuvent échanger des populations (invasion écologique).

Notre intérêt s'est porté essentiellement sur le cas d'échanges d'individus (ou de groupes d'individus) entre populations dans le cadre de cette thèse, mais des raisonnements équivalents peuvent expliquer les flux géniques à d'autres échelles. Étudier le flux génique revient à étudier la connectivité (au sens de flux migratoires) du réseau d'une métapopulation.

Différents modèles reflétant les structures possibles d'une métapopulation ont été imaginés par le passé, ils sont généralement classés en cinq catégories [42] (figure I-4) :

- **Métapopulation de Non-Équilibre (NEM)** : système dans lequel les flux migratoires sont suffisamment faibles pour ne pas compenser la probabilité d'extinction d'une niche écologique. Il s'agit du cas extrême où la métapopulation est subdivisée en populations totalement indépendantes et présentant une forte probabilité d'extinction (systèmes isolés).

- **Modèle Classique de Levins (CML)** : à la différence du cas précédent, les populations à forte probabilité d'extinction échangent suffisamment d'individus pour qu'une niche, libérée après l'extinction d'une population, puisse être à nouveau colonisée. Les extinctions de populations sont donc relativement indépendantes les unes des autres, et la métapopulation totale présente une faible probabilité de s'éteindre (distribution en îlots).

- **Modèle de « Patch Occupancy » (POM)** : à la différence du cas précédent, les populations sont interdépendantes en terme d'extinction, elles s'éteindront toutes ensemble ou pas du tout. Dans ce cas, la probabilité d'extinction de la métapopulation est très faible. Si les populations d'une métapopulation échangent beaucoup plus d'individus entre elles qu'avec les populations hors de la métapopulation, alors nous serons dans un cas du POM (distribution en archipel)

- **Modèle Île-Continent de Mac Arthur et Wilson (CIM)** : Il s'agit d'un CML particulier où l'une des populations est « massive » (un continent par rapport aux îles que seraient les autres populations), et échangerait beaucoup d'individus avec les autres populations et aurait une probabilité d'extinction plus faible qu'elles. Ces dernières échangent entre elles beaucoup moins d'individus qu'avec la population massive. Ce modèle est assimilable au modèle « Source-puits » de Pulliam qui manifeste des différences de rendement entre les différents environnements : les populations sources produisent plus de descendants que nécessaire (ressources abondantes) et dispersent l'excédent vers d'autres populations dont la croissance est plus faible.

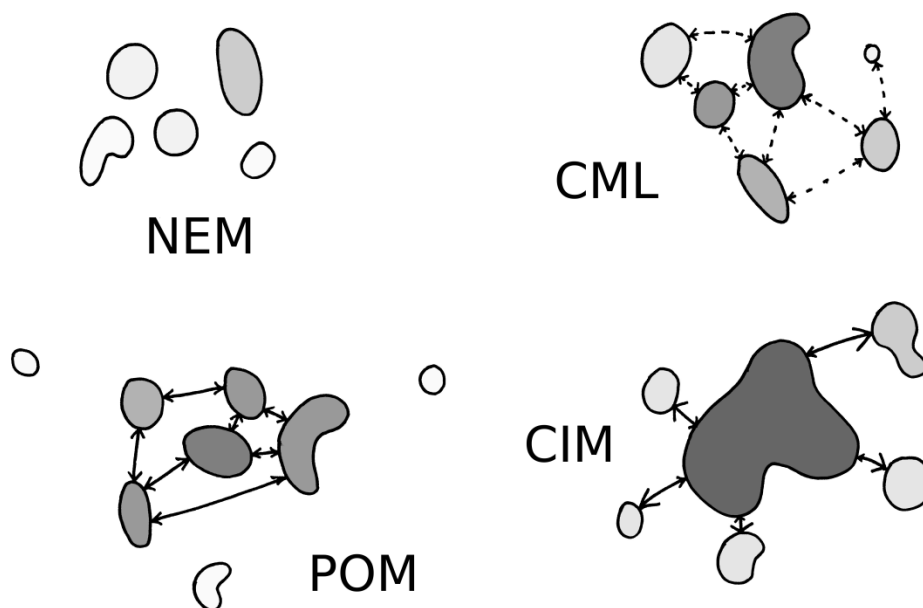


Figure I-4 : Schématisation des 4 modèles classiques de métapopulations. Le NEM correspond à des populations isolées, le CML à des populations pratiquant un peu d'échanges, le POM à un ensemble de populations beaucoup plus soudées que celles qui les entourent, et le CIM à une population source pourvoyant en individus des populations puits. En laboratoire, nous voulons manipuler un NEM, mais il s'agit souvent d'un CML (faibles contaminations) ou d'un CIM (biais biologique).

- Modèle général : Ce modèle est intermédiaire entre les différents modèles précédents, il assimile, entre autres, une population de type « continent » à une métapopulation du POM. Il s'agit donc d'un CML structuré « spatialement » : les individus n'ont pas la même probabilité de se disperser dans chaque population.

L'impact du flux génique va à l'opposé de celui de la dérive génétique, il augmente la diversité des sous-populations mais diminue celle de la métapopulation. Il s'agit d'un lien qui unifie les populations en limitant leur divergence les unes des autres, en réduisant la contrainte des frontières spatiales, et qui isolent sinon les populations. En corollaire de leur isolation, et des limitations conséquentes d'échanges de gènes, nous nous attendons à ce que les populations divergent exponentiellement de par la dérive génétique, la diversification par mutations ou la sélection des allèles les plus adaptés à la niche locale de la population. Mais si le flux génique est assez important, les populations isolées ne vont plus diverger aussi rapidement, ou même ne plus diverger du tout au point de rassembler toutes les populations comme une unique population. Si les petites populations, diversifiées par l'apport continu de gènes extérieurs, auront une faible probabilité de s'éteindre, la diversité de la métapopulation sera la même que celle des petites populations et ses risques d'extinction à peu près identiques.

Au sein d'une population non structurée spatialement (structure hiérarchique, affinité comportementale, appariement sexuel, etc.), le flux génique aura un impact encore plus grand : non seulement il réduira la divergence des deux sous-populations, mais ce « rapprochement » va de plus augmenter le flux génique (l'intensité du flux génique augmente avec le rapprochement géographique ainsi qu'avec le rapprochement phénotypique). Il faut donc des critères sélectifs forts (sélection naturelle, fécondation non aléatoire) pour maintenir la compartimentation intra-population et permettre à la population de se diversifier, malgré le flux génique.

Un dernier effet néfaste du flux génique sur la diversité est l'accentuation de l'envahissement. Si un individu présente une valeur sélective remarquable, il va très vite pouvoir se propager dans l'ensemble de la métapopulation jusqu'à disparition des autres individus, des ressources ou de lui-même. C'est ce que nous pouvons observer avec les espèces invasives, les parasites, les épidémies, ou les cellules tumorales circulantes.

Nous étudierons le flux génique dans le cadre de notre dispositif expérimental et de notre modèle biologique dans le chapitre III.

I.1.B.4 Les sources de diversité : notion de mutation

Nous avons évalué, jusqu'à maintenant, les facteurs qui contribuent à diminuer ou accroître la diversité spécifique, considérant de facto qu'une forme de diversité existait. Une espèce étant par définition une population isolée génétiquement (sans flux génétique avec les autres espèces), sa diversité devrait nécessairement décroître à cause de la dérive génétique, pourtant celle-ci se maintient naturellement ou s'accroît. Il existe donc un ou plusieurs agents permettant la diversification de cette espèce.

Sans a priori sur cette source de diversité, cet agent, cette mutation (au sens général et initial du terme), nous savons par définition qu'elle présente une certaine probabilité d'apparition, qu'elle doit être héritable, dans une certaine mesure, et « conséquente » (ce qui n'implique pas que ces conséquences impactent la valeur sélective de l'organisme), là aussi dans une certaine mesure.

La notion d'héritabilité est facilement compréhensible, il nous suffit d'évaluer le temps moyen de persistance de cette mutation (en absence de toute sélection, aléatoire, naturelle ou artificielle), c'est à dire le nombre de générations sur lesquelles la mutation n'a pas été inversée (retour à l'état initial). Par simplification, l'individu peut être dans deux états, pour une mutation donnée, mutation ou absence de mutation. A chaque génération, le système présente une certaine probabilité de changer d'état, mais cette probabilité n'est pas nécessairement la même pour passer de l'état « mutant » à normal et réciproquement. L'espérance du temps de persistance du système dans un état présentant une probabilité p de changer d'état est donnée par l'équation I-1 :

$$E(t) = \frac{\ln(2)}{\ln\left(\frac{1}{1-p}\right)} \approx \frac{\ln(2)}{p} \text{ pour } p \ll 1$$

Equation I-1 : Espérance de la durée (en générations) $E(t)$ pendant laquelle un système reste dans un état alors qu'il a une probabilité p de changer d'état.

Évaluer si une mutation est conséquente revient à évaluer si l'état « mutant » perturbe l'état global du système, c'est à dire s'il peut coexister avec d'autres états de conséquence équivalente. En d'autres termes, il s'agit d'évaluer le nombre d'états (de mutations de même nature) pouvant coexister. Dans une certaine mesure, si un organisme n'a qu'un nombre limité de mutations possibles, celles-ci seront conséquentes (en proportion du nombre d'autres sites de mutations potentielles) mais aussi devront être conséquentes vis à vis du phénotype pour justifier leur diversification et l'adaptabilité de la lignée de l'individu. Nous pouvons aussi noter, en toute logique, que plus une mutation est conséquente et moins il est probable qu'une mutation quelconque apparaisse, et à l'inverse, moins une mutation est conséquente et plus la probabilité qu'une mutation quelconque apparaisse est grande.

Les mécanismes de diversification spontanés que sont entre autres, les fluctuations d'expression génique ou phénotypique (l'écart entre le phénotype « programmé » et le phénotype effectif), la plasticité du réseau de régulation, la méthylation de l'ADN, les variations de phase ou encore la mutation génétique seront détaillés dans la partie I.B dans le cadre du modèle biologique utilisé dans cette thèse.

Pour conclure sur la notion de mutation et de diversification, nous allons émettre deux remarques. Tout d'abord, nous n'avons ici considéré que des mutations spontanées non induites par un autre état de l'organisme, car le lien de causalité entre la « source spontanée » de la mutation et la diversification n'est pas évident à toutes échelles. Par exemple, il est clair que la mutation d'un gène est liée à la mutation d'un codon (la probabilité de mutation du gène est donc le produit de celle du codon multiplié par le nombre de codons dans le gène et pourrait donc suivre la tendance observée sur la figure), en revanche la régulation programmée de l'organisme est plus délicate à aborder. Notre seconde remarque découle de la première : nous n'avons pas pris en compte de mécanismes de diversification induits, il s'agit à notre point de vue d'une réponse adaptative élaborée à des « mutations » spontanées dont l'équilibre (entre deux états)

a été déplacé. La diversité que nous chercherions à sélectionner dans notre étude doit être stable et de fréquence d'apparition raisonnable, sinon il s'agit plus d'une variabilité entre individus, un « bruit » phénotypique à moyen terme. Dans le cas de cette diversification induite, notre intérêt se porterait moins sur cette diversité induite que sur l'origine de cette source de diversification, qui, elle, doit faire partie du génome de l'individu.

Ce seront donc les mutations génétiques auxquelles nous nous intéresserons dans cette thèse comme facteurs de diversification, et nous chercherons à évaluer un certain degré de diversification dans le chapitre IV.

I.1.B.5 La sélection

La sélection naturelle est considérée depuis Darwin comme le mécanisme ultime de l'évolution des espèces, en effet il est le seul mécanisme adaptatif, car non aléatoire (comme la dérive génétique ou les mutations) mais lié à l'environnement. Elle manifeste l'avantage reproductif dont bénéficie l'organisme le plus adapté à des conditions précises, les caractères les plus avantageux aux individus vis à vis de leur milieu vont ainsi être naturellement transmis favorablement à la génération suivante à condition qu'elle soit héréditaire. Au fil des générations, ceci explique l'adaptation des espèces à leur environnement.

I.1.B.5.1 Un facteur de l'évolution

Depuis la première théorie de Darwin, les scientifiques ont cherché à formaliser et à abstraire le mécanisme évolutif de la sélection et ses implications sur la diversité, sous forme de « lois de l'évolution », c'est à dire les conditions nécessaires et suffisantes pour qu'il puisse y avoir évolution, conditions généralement résumées en « hérédité, variabilité, reproduction ». Par exemple, Weismann écrit en 1909 que « le processus de sélection découle, comme une nécessité logique, de l'accomplissement des trois postulats préliminaires de la théorie : variabilité, hérédité, et la lutte pour l'existence, avec un énorme ratio d'élimination dans chaque espèce. », de même Richard Lewontin va à plusieurs reprises reformuler ces trois principes en entendant la « variation du phénotype, la relation entre le phénotype et la valeur sélective, et la valeur sélective héréditaire » comme les principes de la sélection.

En résumé, nous retiendrons les trois conditions nécessaires et suffisantes suivantes (choisies car valables hors de la biologie) :

- Des entités sont produites sur le modèle d'entités préexistantes [sélection, reproduction]
- Cette capacité à servir (à être reproduit) de modèle leur est, entre autre, transmise [hérédité]
- Cette reproduction n'est pas parfaitement fidèle [variabilité]

Utilisons, pour décrire ces conditions, une métaphore qui ne relève pas de la biologie : un potier qui fabriquerait des pots en recopiant un pot choisi parmi les derniers produits (et non selon un plan générique) ferait évoluer ses pots s'il ne fait pas toujours une reproduction fidèle (par erreur ou créativité). Si de plus la probabilité pour chaque pot d'être choisi dépend de la perception qu'en a le potier, cette évolution sera adaptative : les pots évolueront de manière à être plus souvent choisis. Cette démarche de la recherche de systèmes darwiniens est devenu de plus en plus courante, nous parlons ainsi désormais de « Darwinisme social », de « Mémétique » ou encore d'algorithmes génétiques.

Avec un peu de recul, la sélection, comme facteur d'évolution, est elle-même soumise à la sélection et à l'évolution. En effet, dès qu'une entité est produite sur la base d'une entité précédente, la valeur reproductive de l'entité va favoriser les entités aux meilleures valeurs reproductives, par définition. Dès que cette valeur reproductive sera plus ou moins transmissible, alors cette propriété (valeur reproductive héréditaire) sera fortement sélectionnée. Si cette hérédité est « parfaite », l'entité sera fixée dans son état, et ne sera plus capable de s'adapter en fonction de conditions environnementales fluctuantes influençant sa valeur reproductive. Nous pouvons aussi remarquer que la variabilité doit elle aussi être transmise, dans le cas contraire la variabilité ne serait qu'un « bruit » d'hérédité autour d'une valeur reproductive cible. En d'autres termes, si une entité est reproduite à partir d'une autre entité (et non sur la base d'un modèle fixé), un mécanisme héréditaire avec variabilité sera naturellement sélectionné, à condition qu'un tel mécanisme puisse exister.

I.1.B.5.2 Impact sur la diversité

La sélection naturelle tendra à sélectionner les organismes les mieux adaptés aux conditions naturelles, mais il s'agit d'organismes au sens large : un système capable d'être reproduit avec une hérédité partielle. La sélection naturelle intervenant donc aux différentes échelles du vivant, du gène à l'écosystème, nous ne pouvons comprendre le résultat d'un processus de sélection qu'en étudiant l'ensemble de l'organisme. En effet, à une échelle donnée, le résultat d'un processus de sélection peut être contre-intuitif (la valeur reproductive de l'organisme sélectionné peut ne pas être la meilleure), mais à une autre échelle, ce résultat apparaît comme bénéficiaire.

De manière générale, la sélection intervient lorsque des individus d'un phénotype donné génèrent un nombre de descendants plus importants que celui produit par des individus présentant un phénotype alternatif. Ce succès en matière de reproduction est évalué en comptant le nombre de descendants survivant à la génération suivante, c'est ce que nous appelons la « valeur sélective », ou fitness (que nous avons désigné jusque maintenant par abus de langage, comme la valeur reproductive ou sélective, la capacité à augmenter sa représentation au sein d'une population). Il s'agit d'une valeur relative, c'est à dire le rapport entre la descendance survivante d'un phénotype et celle du meilleur phénotype. La sélection naturelle semble donc généralement diminuer la diversité en sélectionnant systématiquement la même lignée d'individus.

Pourtant, la sélection naturelle peut aussi maintenir la diversité des populations. En effet, la sélection peut être oscillante et sélectionner tour à tour les individus selon différents critères. La sélection peut aussi dépendre de la fréquence des individus : si un individu est surreprésenté dans la population, il peut être une cible privilégiée des prédateurs. Ceci s'explique par la nouvelle niche alimentaire que forment les individus surreprésentés, les prédateurs seront plus efficaces à chercher une proie s'ils en cherchent un type en particulier, il y a donc un avantage sélectif pour le prédateur à cibler les individus au phénotype le plus représenté. Enfin, dans le cas des organismes diploïdes, la sélection naturelle avantage les hétérozygotes, par exemple dans le cas où l'un des allèles est néfaste la plupart du temps mais représente un avantage sélectif ponctuellement (exemple de l'anémie à cellules falciforme, une maladie génétique qui provoque un avantage sélectif vis à vis du paludisme).

I.1.B.5.3 Formes de sélection

La sélection n'est pas nécessairement unidirectionnelle, nous comptons en fait trois types de sélection :

- La sélection directionnelle favorise les phénotypes d'un extrême d'une distribution phénotypique et décale cette distribution.
- La sélection stabilisante favorise les phénotypes les plus représentés (phénotypes intermédiaires) et resserre donc la distribution.
- La sélection diversifiante favorise les phénotypes de différents extrêmes d'une distribution et fait donc diverger la distribution.

Dans des conditions normales, une population est adaptée à son milieu, tout en cherchant à s'en écarter (diversification naturelle), la sélection du milieu doit donc être stabilisante pour maintenir la population autour de son équilibre. Une sélection diversifiante est souvent aussi nécessaire à l'équilibre et participe à la conservation de la diversité de la population. Si le milieu est modifié, l'équilibre est rompu et la sélection sera généralement directionnelle. A ces types de sélections, nous pouvons aussi préciser quelques formes de sélections intrinsèques ou propres à une population :

- La sélection négative permet d'éliminer les allèles délétères ou défavorables aux individus en défavorisant les individus les moins adaptés de la population.
- La sélection sexuelle, elle, favorise les individus en apparence les plus adaptés, qui sont susceptibles de donner une meilleure descendance.
- La sélection disruptive favorise les phénotypes hors-norme et rares et laisse donc sa chance à « l'innovation » afin de tester si elle est viable, ou non.
- La sélection « fréquence-dépendante » défavorise les phénotypes les plus communs.

Ces différents types de sélection sont appliqués par l'écosystème et maintiennent la population dans un équilibre diversifié, lui permettant à tout moment de s'adapter. Dans le cas des espèces invasives, ces dernières ne sont pas équilibrées par le nouvel écosystème qu'elles envahissent, contrairement à leurs potentiels compétiteurs déjà présents sur cette niche dans le milieu. N'étant donc pas réfrénés dans leur croissance, ces envahisseurs vont pouvoir monopoliser une niche et bouleverser l'écosystème dont l'équilibre dépendait du précédent compétiteur. Cette invasion étant peu diversifiée, elle est une niche favorable aux maladies, parasites et prédateurs opportunistes qui risquent ainsi de pénétrer l'écosystème et d'achever de le bouleverser. L'équilibre maintenu par la sélection est donc sensible à l'arrivée de nouveaux occupants d'une niche écologique, un écosystème se stabilise donc en occupant efficacement toutes ces niches avec une forte diversité d'espèces afin de ne pas permettre à un envahisseur de se fixer dans une niche. L'érosion des écosystèmes par l'homme les rend donc beaucoup plus susceptibles d'être envahis, de même la diminution de la diversité du micro-biome (le patrimoine génétique du micro-biote) par une alimentation inadaptée rend l'être humain plus sensible aux invasions de micro-organismes pathogènes.

I.1.B.5.4 Compétition entre sélection naturelle et sélection aléatoire

La dérive génétique peut être opposée à la sélection naturelle dans le sens où elle est une « sélection aléatoire », et donc non adaptative. La dérive génétique permet donc d'atténuer la sélectivité de la sélection naturelle en laissant plus de place à la diversité : l'organisme le mieux adapté n'est pas nécessairement celui qui va être sélectionné par la combinaison de la sélection aléatoire et de la sélection

naturelle. Selon les conditions de la population et de la « pression de sélection » (qui cause une forte hétérogénéité de la distribution des valeurs sélectives des individus d'une population), la sélection aléatoire sera plus ou moins forte que la sélection naturelle. L'évolution d'une population peut donc être dans trois régimes : un régime où l'évolution est conditionnée par la sélection aléatoire, un régime où elle est conditionnée par la sélection naturelle, et enfin un régime intermédiaire.

La diversité d'une population est conditionnée par le régime dans lequel elle se trouve au cours du temps, la diversité maximale étant obtenue dans le régime intermédiaire. En effet, si la population est soumise à une très forte sélection ou à une très forte dérive génétique, sa population diminue, ainsi que sa taille effective, ces deux régimes sont instables. Si une population est soumise à une forte dérive génétique, elle va (dans le cas extrême sans extinction) laisser une seule lignée se propager, et au fur et à mesure que cette lignée va croître, elle sera de moins en moins sensible à la dérive génétique et va se diversifier. De même, si une population est soumise à une pression de sélection drastique ne laissant survivre qu'un unique individu, celui-ci pourra se propager (comme il est adapté au stress de sélection, il n'en sera que peu affecté) puis se diversifier : les valeurs sélectives des différents descendants seront tous du même ordre de grandeur, et la lutte pour l'existence sera moins rude.

Si une augmentation de la sélection (naturelle ou aléatoire) induit un écartement de l'état de la population par rapport à son état d'équilibre, la diversification permet donc un retour à cet état d'équilibre. Cet état d'équilibre (que l'on peut envisager comme le maximum de diversité) qui représente la frontière entre sélection aléatoire et naturelle, n'est pas fixe, il est fonction de la structuration de la population et de sa taille à l'équilibre (et donc des flux géniques inter et intra-populations). Enfin, il faut noter que la sélection sur un caractère affecte aussi la diversité des autres caractères : si une pression de sélection est exercée sur un gène, une dérive génique est observée sur les autres gènes indépendants. Une pression de sélection trop forte peut donc sélectionner aléatoirement des allèles délétères sur des gènes indépendants.

I.1.B.5.5 La sélection artificielle

À la différence de la sélection aléatoire (non adaptative) et de la sélection naturelle (adaptative, autorégulée), la sélection artificielle est une forme de sélection adaptative régulée par un opérateur extérieur « conscient ». Il y a volonté d'imposer un stress de sélection, et donc de modifier artificiellement la valeur reproductive des individus d'une population afin de modifier le caractère de la population.

L'homme pratique la sélection artificielle depuis l'invention de l'agriculture et la domestication animale, mais cette sélection artificielle a toujours été effectuée sur les individus et non sur les populations. En effet, l'homme a cherché à améliorer la « productivité » d'un caractère d'un individu, entité manipulable et sélectionnable à l'échelle humaine. La conséquence principale de cette approche est une diminution de la diversité spécifique : l'élevage sélectif des animaux, ainsi que la culture sélective des plantes conduit à la diminution de la taille effective de leur population, et ce, même si la population globale est grande (taille de la population maintenue par la sélection justement). En effet, l'homme ne peut pas gérer une population entière en gérant chaque individu, il sélectionne donc un faible nombre de reproducteurs à chaque génération.

Les populations d'élevage sont donc très sensibles à la dérive génétique. Cet effet n'a pas eu un impact trop néfaste ces derniers milliers d'années car les processus d'élevage et de sélection restaient locaux, ce qui assurait une divergence génique des populations même petites, compensée par des échanges fréquents de bétails/varieties entre éleveurs. La diversité apparente des espèces d'élevage a donc pu se

maintenir ou s'accroître, d'autant plus que ces espèces n'ont jamais été totalement isolées de toute sélection naturelle. En revanche, depuis environ un siècle, l'élevage se fait à très grande échelle : il existe un plus petit nombre de sous-populations représentant un plus grand nombre d'individus chacune mais présentant aussi une taille effective faible (quelques reproducteurs pour une population entière), on observe ainsi la fixation de tares génétiques, un affaiblissement global de la vigueur des populations et une difficulté certaine à « innover » de par les seuls mécanismes de la sélection artificielle : le génie génétique fait désormais partie des outils nécessaires de l'éleveur. De plus, le recours à l'assistance systématique des plantes et du bétail (médicaments, reproduction assistée, hormones de croissance, pesticide, etc.) annihile les effets de la sélection naturelle. Les méthodes actuelles de sélection artificielle semblent donc ne pas être des méthodes pérennes pour répondre durablement aux besoins humains. Des défauts similaires sont aussi observés dans les écosystèmes qui interagissent avec l'homme. Le principal défaut dans la vision commune est une confusion entre la diversité spécifique et la diversité interspécifique : par exemple dans le cas de l'élevage, c'est confondre la diversité observée entre les différentes « races » et la richesse du patrimoine génétique de la population.

I.1.B.6 La diversité en question

En conclusion de cette partie, nous pourrions dire que la gestion de la diversité est le point clef devant précéder tout mécanisme de sélection, qu'elle soit aléatoire, naturelle ou artificielle. Cette diversité ne peut se résumer à la gestion d'un faible nombre d'individus, il faudrait développer des outils et notions d'ingénierie des populations pour pouvoir effectuer durablement une sélection viable sur les individus. Le problème serait donc de pouvoir jouer avec les trois sélections possibles afin de permettre à la population d'avoir accès à un maximum de diversité et de sélectionner la population selon ses performances en oscillant entre les trois mécanismes de sélections.

Si cette thèse ne portera pas directement sur l'ingénierie des populations ou sur les stratégies de sélection à leur appliquer, elle portera plutôt sur un outil pouvant permettre l'ingénierie de certains types de populations, et pourrait donc entre autres permettre de faire de l'évolution dirigée des populations. Si les caractéristiques fondamentales de cet outil seront peu à peu développées dans ce tapuscrit, le chapitre V qui clôt cette thèse, lui sera essentiellement consacré.

I.2 Microbiologie et évolution

Dans la partie précédente, nous avons présenté l'intérêt de faire évoluer des populations et non des individus, la diversité de la population étant la clef de voûte de tout processus évolutif. S'il semble difficile de manipuler des populations macroscopiques, il est beaucoup plus abordable et tout aussi probant de s'intéresser aux populations de micro-organismes.

Cette approche présente plusieurs intérêts, tout d'abord leur petite taille permet la manipulation de très larges populations. Ensuite, le temps d'une génération peut être assez court (moins d'une heure, contre une semaine à plusieurs années pour le règne animal) et leurs conditions de croissance sont faciles à contrôler, ce qui en fait des modèles privilégiés de laboratoire, en particulier pour étudier l'évolution. Enfin, les micro-organismes représentent des enjeux écologiques, industriels et sanitaires critiques, ainsi l'étude et la bio-ingénierie des populations de micro-organismes par évolution dirigée ont, elles, un intérêt certain.

Nous présenterons succinctement dans cette partie le modèle biologique utilisé, la bactérie *E. coli*, les notions clés spécifiques à sa diversification et à son évolution, puis nous nous intéresserons à un cas particulier de pression de sélection applicable à notre modèle : les antibiotiques.

I.2.A Présentation de *Escherichia coli*

I.2.A.1 Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes autonomes généralement unicellulaires. Ils forment l'un des trois grands clades qui divisent le monde vivant, les deux autres étant les archées, aussi procaryotes, et les eucaryotes. Elles se distinguent de ces derniers par leur structure cellulaire (en particulier l'absence de noyau ou d'organites), et des archées par une structure génétique et chimique différente. Leur taille est souvent comprise entre $0,2\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}$, mais certaines peuvent avoir la taille d'un virus moyen (moins de 100 nm comme les « ultramicrobactéries ») et d'autres atteindre presque le millimètre de longueur (genre *Thiomargarita*).

Leurs formes sont très variées mais sont généralement sphériques (les coques) ou en bâtonnets (les bacilles). Cette diversité de formes multiplie les manières dont elles peuvent se dupliquer, se nourrir, se mouvoir ou s'accrocher. A part s'accrocher à un substrat, elles peuvent s'associer en groupe de bactéries, certaines espèces ne se trouvent ainsi que sous forme d'amas organisés (filaments, biofilms, trichomes), et d'autres peuvent occasionnellement s'agréger en réponse à certaines conditions du milieu ou comme stratégie de survie systématique.

Leur structure cellulaire est assez simple (figure I-5) : une paroi cellulaire (à une ou deux membranes) contenant le cytoplasme. Les bactéries possédant seulement une membrane de

peptidoglycane sont dites Gram positives, car cette membrane est perméable au colorant de Gram, en revanche les bactéries possédant une membrane supplémentaire externe sont dites Gram négatives. Il n'y existe en général pas de structure secondaire isolée, toutes les réactions chimiques, les équilibres, le matériel génétique baignent donc dans le cytoplasme. Ce matériel est généralement un chromosome unique circulaire, mais certains gènes particuliers peuvent être localisés sur des petites sections d'ADN circulaire libre (plasmides). Leur métabolisme est extrêmement diversifié, ce qui permet aux bactéries d'assurer un grand nombre de fonctions autotrophes (génération de biomasse à partir de matière non organique) à la base de la chaîne du vivant qui est surtout hétérotrophe (production de biomasse à partir de matière organique) à plus grande échelle, et d'avoir accès à des sources d'énergies assez variées (chimiotrophie, phototrophie). La théorie endosymbiotique est l'hypothèse selon laquelle les organites assurant ces fonctions chez les procaryotes (mitochondries, plastes) proviennent de l'incorporation symbiotique de bactéries spécialisées.

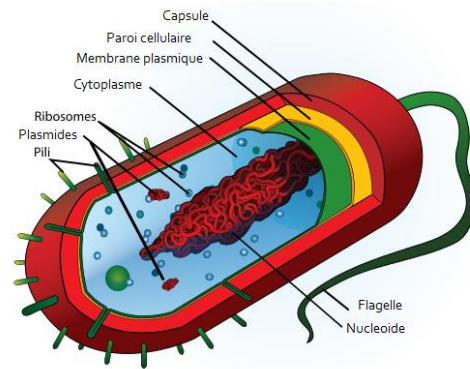


Figure I-5 : Schéma d'une bactérie (source wikipedia)

A l'origine, donc, de la plupart des transformations chimiques fondamentales impliquées dans les processus biogéochimiques responsables du cycle des éléments dans les écosystèmes, les bactéries sont à la base de leur équilibre écologique. En colonisant pratiquement tous les environnements, elles permettent aux autres êtres vivants de s'y installer, et elles peuvent à leur tour s'installer dans ces organismes. La richesse en micro-organismes (biomasse et diversité) est alors un facteur déterminant de la stabilité de l'écosystème. Les microbiotes (sol, aliments, appareils digestifs ou génitaux, système cutané, etc.) sont un parfait exemple d'écosystème microbiologique commensal très riche en espèces formant avec leur hôte un « holobionte », ils sont tellement devenus indissociables de leur hôte que l'on parle désormais d'un métagénome qui évoluerait comme un seul génome, c'est la théorie hologénomique de l'évolution. A titre d'exemple, le microbiote intestinal humain présente une diversité génique bien plus grande que celle de son hôte (500 000 gènes en moyenne contre 25 000 gènes) et est ainsi capable de s'adapter et d'évoluer plus rapidement que son hôte, l'aidant ainsi à faire face aux aléas des apports nutritionnels, en lui produisant certains nutriments non synthétisés par l'organisme, mais aussi en empêchant les organismes pathogènes de se fixer dans l'intestin.

Par de nombreux aspects, l'écologie des populations microbiennes représente donc de nombreux enjeux, mais elle est encore peu comprise et n'est exploitée que de manière simpliste. Ses multiples applications couvrent l'agriculture, la santé, l'industrie, la dépollution, l'agroalimentaire... Il est donc tout à fait justifié de comprendre l'évolution et la diversité des populations bactériennes, et de penser que de telles populations peuvent être « évoluées » pour répondre à un besoin particulier. Les bactéries étant des modèles classiques de laboratoire pour étudier l'évolution, elles s'avèrent être de bons candidats pour notre étude.

I.2.A.2 Cycle cellulaire bactérien

Les bactéries se reproduisent en se dupliquant simplement en phase de croissance active avec un partage équivalent du matériel génétique, et statistiquement équivalent des différents composés intracellulaires. La bactérie se duplique en trois étapes, elle initie tout d'abord la réplication de son chromosome, puis fait migrer aux deux extrémités de la cellule chacun des dupliquas, enfin, par l'accroissement de sa taille, la bactérie finit par se diviser en deux après avoir dépassé une taille seuil.

Le métabolisme de la bactérie doit pouvoir effectuer au moins quelques opérations élémentaires pour pouvoir se multiplier : produire les bonnes protéines (régulant le métabolisme) à partir de son ADN, dupliquer son ADN, augmenter la taille de sa membrane. Si un élément venait perturber l'une de ces étapes clés, la bactérie pourrait stopper sa croissance, sa multiplication ou se détruire. C'est en général le principe de l'activité des antibiotiques.

Les protéines sont synthétisées en deux étapes : la transcription d'une partie de l'ADN en ARN messenger par l'ARN polymérase, puis la traduction de l'ARN messenger en protéine par le ribosome. Un gène peut être assimilé à une chaîne d'ADN codante pour une protéine, cette dernière, pouvant combiner son effet à celle d'autres molécules (ARN, autres protéines, molécules produites par la bactérie ou externes), va influencer sur le réseau de régulation de la bactérie et donc influencer sur l'expression d'autres gènes ou sur le développement de la bactérie. ARN et protéines permettent donc d'effectuer un lien crucial entre le génotype et le phénotype de la bactérie.

I.2.A.3 *E. coli*, modèle de laboratoire

Découverte par Theodor Escherich en 1885, *E. coli* est un coliforme fécal des homéothermes, en particulier de l'homme. Il est généralement commensal, mais peut cependant être pathogène, impliqué dans des troubles digestifs ou urinaires jusqu'à des méningites. Elle est un bacille aérobic facultatif (croissance préférentielle en présence d'oxygène), Gram négative et mesure en moyenne 2µm de long (sa taille dépend de la souche et de son état dans son cycle cellulaire).

Elle est capable de doubler tous les 20 minutes dans des conditions optimales, ce qui a participé à faire d'elle le micro-organisme le plus utilisé et le plus étudié en laboratoire. Bien plus qu'un modèle très bien connu, il est devenu un outil de laboratoire ou de production à part entière (production d'enzymes de restriction, d'hydrocarbures, etc.).

La souche de laboratoire que nous utilisons, *E. coli* Δ*flu*, est issue de la souche MC4100, très utilisée en recherche, dérivant de la souche sauvage K-12, et très documentée. Elle ne présente ni flagelle (non mobile), ni de fimbriae (pili facilitant l'adhésion) [71], ni de plasmide (pas de facteur F et donc transfert horizontal spontané limité). Un gène de fluorescence a été ajouté à son chromosome avec un gène de résistance à l'ampicilline [45]. Elle présente par ailleurs un gène de résistance à la kanamycine.

Le génome des souches de *E. coli* que nous utilisons est constitué de 4,6 millions de paires de bases, soit plus de 4200 gènes codants pour des protéines. Ce génome diffère beaucoup d'une souche à une autre, par exemple, la souche pathogène qui a affecté l'Allemagne en 2011 comprend 5,5 millions de paires de base pour 5400 protéines, et moins de la moitié de ses gènes sont communs avec notre souche de laboratoire, ce qui reflète les très fortes capacités de diversification de *E. coli* (en comparaison, l'homme et la souris partagent 98 % de leurs gènes).

I.2.B L'adaptabilité de *E. coli*

I.2.B.1 Valeur sélective (fitness)

Nous avons vu que la sélection favorisait les individus capables d'avoir la plus grande descendance viable. Dans ce sens, l'adaptation d'un individu ou d'une population, qui représente normalement leur modification fonctionnelle à leur environnement, se traduit ici comme la performance à transmettre ses caractères, et donc à accroître la présence de ce caractère par rapport aux autres caractères de la population ou de l'écosystème [67]. Sous l'hypothèse que cette transmission ne se fasse que par reproduction, nous pouvons assimiler cette performance et ce succès dans la compétition à la valeur sélective (voir I-1-A-5).

Dans le modèle évolutif r/K introduit par MacArthur et Wilson en 1967, deux paramètres conduisent la stratégie d'adaptation d'une espèce. « r », le taux de reproduction (dépendant des taux de natalité et mortalité), définit une stratégie basée sur une très forte reproduction à mortalité élevée, c'est une stratégie d'adaptation aux conditions instables et sélectives, c'est généralement la stratégie adoptée par les bactéries. « K », la capacité d'accueil du milieu, définit, lui, une stratégie basée sur une durée de vie longue, une reproduction faible mais à fort succès, c'est une stratégie d'adaptation à un milieu stable. Les êtres vivants choisissent en général des stratégies intermédiaires. L'augmentation de la représentation d'un individu est alors conditionnée par l'équation différentielle I-2 :

$$\frac{dN}{dt} = rN\left(1 - \frac{N}{K}\right)$$

Equation I-2 : Augmentation du nombre d'individus N(t) dans le cas d'un modèle r/K où r est le taux de reproduction et K la capacité du milieu.

On assimilera la valeur sélective d'une bactérie sous une forme phénotypique donnée à son « avantage sélectif », s, ce qui décrira ses dispositions à disparaître ou à envahir un milieu. Sa proportion, x, dans la population ou l'environnement nous sera alors donnée par l'équation simplifiée I-3 :

$$\frac{dx}{dt} = s * x$$

Equation I-3 : Variation de la proportion x d'une entité dans une population où s est sa valeur sélective.

Cette notion d'avantage sélectif semble donner un côté absolu et fataliste à la survie d'une lignée d'individus : deux lignées d'avantages sélectifs différents ne pourraient cohabiter, la plus faible d'entre elles devrait finir par s'éteindre. Nous pouvons mesurer cet avantage par plusieurs facteurs, d'une part les espèces ou lignées d'individus peuvent avoir un avantage sélectif interdépendant, d'autre part cet avantage sélectif ne représente pas l'avantage sélectif instantané d'un individu, mais celle d'un ensemble d'individus sur plusieurs générations. En effet, comme nous l'avons vu, le phénotype peut fluctuer au cours des générations pour une même lignée, et ce, avec des intensités et sur des échelles de temps variables. Si cette variabilité est motrice dans la diversification de la lignée, elle permet aussi aux autres lignées, d'un avantage sélectif moins important, de mieux pouvoir persister.

La croissance de micro-organismes dans un système fini est bien approximé par l'équation I-2. Dans le cas d'un système fermé, limité en nutriments, la figure I-6 montre le comportement général de la croissance d'une population. Cette représentation de l'évolution du nombre d'individus en fonction du temps d'incubation met en évidence quatre phases distinctes principales lors de cette croissance :

- **La phase de latence** : il existe généralement un délai d'adaptation des bactéries entre le moment de leur introduction dans le nouveau milieu et le début de leur multiplication. Cette durée dépend de différents facteurs, mais essentiellement des différences entre le milieu dont est extraite la population et ce nouveau milieu.

- **La phase exponentielle** : les bactéries se multiplient par division, leur multiplication est donc exponentielle car la taille de la population double à chaque intervalle de temps, dit « temps de division » ou durée d'une génération. Ce temps caractéristique est en moyenne constant sur toute la phase exponentielle, mais peut varier d'un individu à l'autre. Le nombre d'individus est donc donné par l'équation I-4 :

$$N(t) = N(t = t_0) * 2^{\frac{t-t_0}{\tau}}$$

Equation I-4 : Taille de la population en phase de croissance exponentielle où t_0 est un instant inclus dans cette phase et où τ est le temps de division en phase exponentielle.

- **La phase stationnaire** : Lorsque le nombre de bactéries approche de sa valeur maximale, un des éléments essentiels à la croissance des bactéries commence à être de moins en moins disponible (nutriments, oxygène...) tandis que la quantité de déchets pouvant être sécrétés par les micro-organismes, augmente, la croissance bactérienne ralentit alors jusqu'à un point où la taille de la population n'évolue plus. Ceci peut révéler une absence de division (sans pour autant qu'il y ait mort des bactéries) ou un équilibre entre division et mort cellulaire.

- **La phase de mortalité** : Sans source d'éléments essentiels et avec l'excès de déchets souvent toxiques pour les bactéries, la population n'arrivera plus à compenser les morts cellulaires par la division de nouvelles cellules et diminuera fatalement.

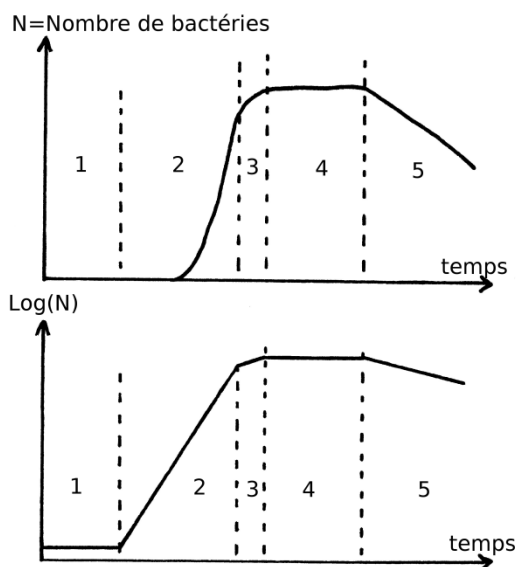


Figure I-6 : Phases de croissance d'une culture de bactéries.

1. Phase de Latence
2. Phase exponentielle
3. Phase de ralentissement
4. Phase stationnaire
5. Phase de mortalité

Nous ne discutons pas de la phase de ralentissement, il ne s'agit que d'une période de transition entre les phases 2 et 4 : les bactéries commencent à sentir une pénurie mais continuent à croître.

I.2.B.2 Variabilité et diversifications : du bruit non héritable aux mutations génétiques

Nous présenterons brièvement ici quelques-unes des causes de variabilité et de diversités propres aux bactéries en particulier et qui peuvent jouer un rôle dans la conservation de la diversité des lignées présentes dans une population. Nous pouvons classer ces causes en trois catégories en fonction de leur héritabilité : la variabilité non héritable, la diversification épigénétique, la diversification génétique.

La variabilité d'un individu par rapport à la tendance de sa lignée découle de deux phénomènes. Le premier est ce que l'on appelle le bruit d'expression génique. Le nombre de molécules, de protéines, d'ARN messager ou encore l'efficacité de la bactérie vont varier d'une bactérie à l'autre. Par exemple, à l'issue de la division cellulaire, les bactéries filles ne seront pas des répliques exactes l'une de l'autre, le temps que chacune mettra avant de se diviser ne sera pas équivalent en particulier. Leur avantage sélectif « instantané » est donc variable, mais cette différence ne sera pas transmise, elle permet pourtant à certains individus d'être plus aptes à résister à un stress soudain (et donc d'assurer la survie de la lignée) sans que le coût de cette préparation n'affecte trop l'avantage sélectif moyen de la lignée. Si cette variabilité est spontanée, la seconde source de variabilité est induite par l'environnement. Il s'agit de la réponse du réseau de régulation de l'expression des gènes à une variation de l'environnement. Il s'agit donc d'un mécanisme adaptatif programmé de la bactérie qui lui permet de modifier son état phénotypique sur des échelles de temps inférieures à la durée d'une génération. Si une bactérie fille peut hériter de l'état du réseau de régulation de sa mère, ce réseau, très plastique, s'adaptera assez rapidement aux nouvelles conditions que pourrait rencontrer la fille. Si elle n'est pas héritable, cette variabilité, spontanée ou induite, est généralement très importante [33] et contribue à réduire le déterminisme sélectif.

Par définition, l'épigénétique étudie les variations héréditaires d'expression génique qui ne font pas appel à des mutations génétiques. Il existe plusieurs vecteurs de sélections des gènes à exprimer, ils entrent tous en jeu au niveau des mécanismes moléculaires qui font le lien entre gène et protéines, ce qui impacte le phénotype. Le mode d'action le plus connu pour jouer sur l'expression d'un gène est d'affecter l'accessibilité du brin d'ADN codant pour le gène : l'ADN est enroulé en bobine autour de protéines, appelées histones, pour former la structure appelée chromatine, qui est une forme difficilement « lisible » de l'ADN et ne favorisant pas l'expression des gènes. Cet enroulement peut être favorisé par certaines espèces, par exemple un groupe méthyle va ainsi diminuer l'expression d'un gène : la méthylation [12]. Au contraire, l'acétylation va entraîner une ouverture de la chromatine, permettant ainsi la transcription et l'expression du gène. Chez *E. coli*, la méthylation est pratiquement irréversible, la bactérie ne possède pas d'enzymes permettant la déméthylation. Cet état « méthylé » (gène inexprimé) est transmis de génération en génération avec une forte probabilité, et seule la réplication de l'ADN permettra à la bactérie de changer d'état d'expression de ce gène (la probabilité de transition entre deux états d'expression génique est de 10^{-2} à 10^{-4} par réplication). Ces possibilités de varier entre deux états phénotypiques se nomment variation de phase, et il permet de maintenir plusieurs états phénotypiques distincts au sein d'une même population, à condition que chacun des phénotypes soit viable.

Nous avons expliqué précédemment que le mécanisme ultime de diversification est la mutation génétique. Ce que nous n'avions pas évoqué et qui s'approche des réflexions précédentes, est que le taux de mutation génétique n'est pas nécessairement homogène dans l'ensemble du génome. Il existe des « points chauds » où la probabilité de mutations génétiques est beaucoup plus forte (100 à 10^5 fois plus élevée) et donc plus facilement réversible. Ces points chauds vont eux aussi être impliqués dans l'expression ou la non expression d'un gène et donc aussi induire une variation de phase, mais à des échelles de temps un peu plus longues que dans un mécanisme épigénétique.

I.2.B.3 Evolution microbiologique en laboratoire

Comme nous l'avons expliqué, les micro-organismes sont un outil de choix pour étudier l'évolution. Leur reproduction rapide permet d'observer leur évolution sur un grand nombre de générations à échelle humaine. Leur petite taille facilite leur manipulation, leur parallélisation et la possibilité de travailler avec un très grand nombre d'individus et donc avec des populations. Nous observons ainsi depuis quelques dizaines d'années une tendance de plus en plus forte à l'utilisation des bactéries pour comprendre les mécanismes évolutifs mais aussi pour des finalités plus pragmatiques : faire évoluer une souche vers un objectif bien précis. Nous présenterons ici deux exemples d'expériences réalisées avec *E. coli* dans chacune de ces optiques. Ces dernières présentent aussi des différences dans la manipulation des populations de bactéries, si celles-ci sont dans les deux cas cultivées et propagées en voie liquide, l'une des optiques est adaptée à la propagation par « serial transfer » et l'autre consistera plutôt en une culture en « chemostat ».

L'expérience moderne la plus connue et la plus documentée sur l'évolution à l'heure actuelle est celle lancée il y a exactement trente ans par Richard Lenski le 24 février 1988 et connue sous le nom de « *E. coli* long-term evolution experiment » (LTEE) [56][75][7][38]. Depuis cette date, 12 populations de *E. coli* sont transférées indépendamment et quotidiennement dans un milieu « pauvre », nouvel environnement auxquelles les populations doivent s'adapter. Ce que nous nommons ici « serial transfer » (figure I-7) concerne la préparation journalière des nouveaux échantillons : on prélève un petit échantillon (environ 5 millions de bactéries) de la population mère (100x plus grande que l'échantillon) que l'on dilue dans un milieu identique et laisse croître à 37°C jusqu'au transfert suivant. L'entretien d'une population de bactéries par serial transfer est donc caractérisé par un effet d'étranglement important mais ponctuel et une taille de population variable (pouvant induire des conditions chimiques du milieu variables, la population étant en régime de croissance exponentielle puis en régime de saturation) : il s'agit d'une croissance séquencée.

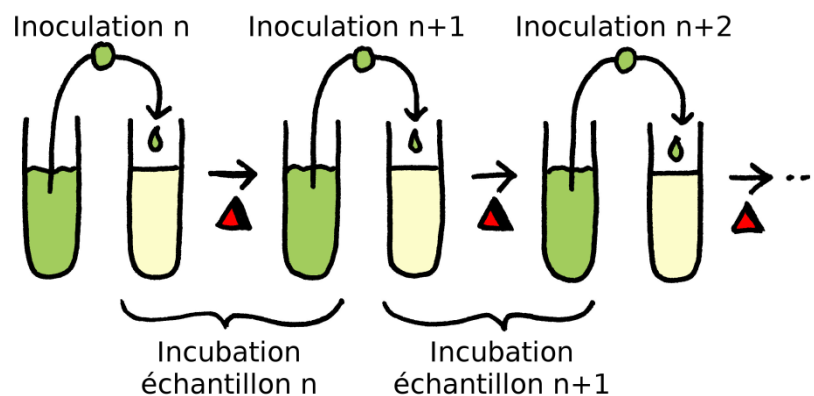


Figure I-7 : Principe du transfert en série (serial transfert) : une lignée de culture est maintenue en croissance en étant propagée régulièrement dans un nouveau milieu à partir de la culture précédente. La taille de l'échantillon transféré est un goulot d'étranglement que subit la population à chaque cycle de culture.

Tout au long de la LTEE, Lenski a noté les évolutions phénotypiques et génotypiques des populations (figure I-8). Si certaines tendances adaptatives sont apparues dans tous les répliquas (comme une augmentation progressive du fitness au début de l'expérience, révélant l'adaptation des bactéries par l'augmentation de leur valeur sélective), d'autres ne sont apparues que dans certaines lignées. Il a ainsi pu

remarquer que trois lignées avaient considérablement augmenté leur taux de mutation avant d'atteindre 10000 générations. En effet, l'expression d'un gène augmentant le taux de mutation génétique peut être favorable à l'adaptation à un nouvel environnement et donc sélectionnée. Cette augmentation du taux de mutation a favorisé l'apparition et la coexistence de deux phénotypes au sein d'un des échantillons. Un autre fait marquant est, une fois le fitness stabilisé, l'apparition dans un autre échantillon d'un mutant métabolisant le citrate, révélant donc la diversification de *E. coli* dans l'occupation de nouvelles niches, diversification devant impliquer la fixation de plusieurs mutations spécifiques, la lignée de ce mutant s'est par la suite éteinte, après l'émergence d'un mutateur dans cette même population.

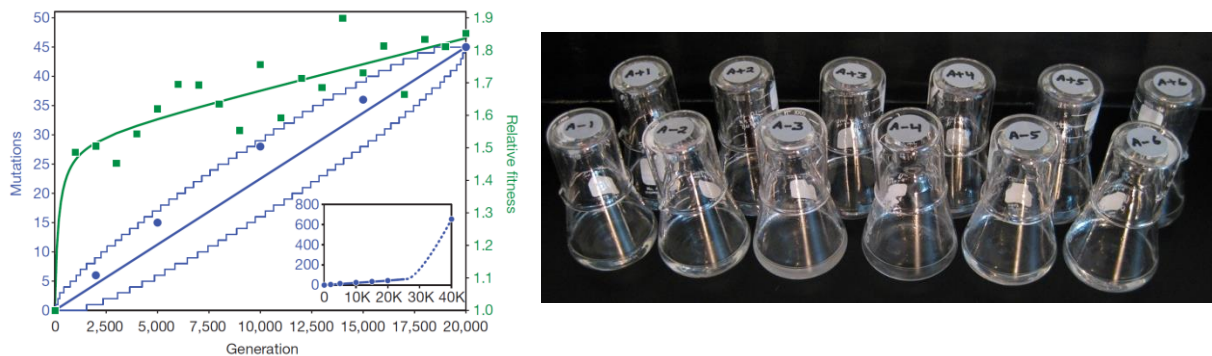


Figure I-8 : « *E. coli* long-term evolution experiment » (LTEE) : Quelques résultats sont représentés sur le graphe de gauche. Nous voyons en vert l'évolution du fitness des populations par rapport à celui de la population ancestrale. Les populations se sont très vite adaptées à ce nouveau milieu pendant les 1000 premières générations, leur fitness augmente, depuis, linéairement mais 10 fois moins vite. En bleu, nous voyons que les populations semblent accumuler des mutations linéairement avec le temps, sauf pour la lignée où un mutateur est apparu et qui se trouve dans l'encart [7]. Les 12 cultures sont représentées à droite, nous pouvons remarquer la culture A-3, plus trouble, où un mutant s'est spécialisé dans la métabolisation du citrate et qui a donc réussi à occuper une nouvelle niche écologique.

La durée, la stabilité et les données de la LTEE font la richesse de cette expérience et explique pourquoi elle s'est vite imposée comme l'expérience d'évolution expérimentale de référence. Les stratégies, associées aux bonnes mutations, librement choisies par le biais de la sélection naturelle et de la dérive génétique ont permis d'y mettre en évidence des tendances universelles de l'évolution telles que l'adaptation de la valeur sélective, l'évolution du génome, la spécialisation écologique ou encore l'équilibre polymorphique. Mais s'il s'agit d'une expérience sur l'évolution, il ne s'agit pas d'une expérience d'évolution dirigée : la pression de sélection reste naturelle, seules les conditions initiales sont artificielles, mais ni les individus ni les populations n'ont été sélectionnés afin de les faire tendre vers un objectif précis.

La seconde expérience que nous avons choisie de présenter est tout à fait différente, par ses objectifs, sa méthode et sa durée. Un chemostat peut être défini comme une culture continue de micro-organismes en bioréacteur où la taille de la population et les conditions du milieu sont maintenue constante [31]. A la différence du serial transfer où la population est périodiquement transférée de milieux en milieux, la population d'un chemostat est fixe tandis que du milieu neuf arrive à flux constant, remplaçant le milieu contenant les bactéries qui est prélevé au même débit (figure II-3). Ce débit de bactéries sortantes conditionne la taille de la population qui doit produire un nombre équivalent de bactéries. Dans les faits, il n'est intéressant de maintenir une population en chemostat que si l'on veut conserver une population homogène adaptée à son milieu, par exemple pour la production de molécules d'intérêt ou de biomasse. Les stratégies adoptées pour faire évoluer une population de bactéries sont plutôt, soit de modifier graduellement le milieu afin de modifier les conditions de la sélection naturelle

sans trop brusquer la population et lui laisser de nombreux chemins adaptatifs, soit d'imposer des conditions oscillantes (alternant des périodes stressantes et relaxantes) de forte amplitude lorsque l'on veut spécifiquement sélectionner les individus les plus adaptés. La pression de sélection varie aussi au long de l'expérience dans ce dernier cas afin d'augmenter le stress au fur et à mesure que les bactéries s'adaptent.

C'est ce dernier cas de figure qui a été choisi par Philippe Marlière et son équipe pour réaliser leur « machine à évoluer » GM3 [63]. L'objectif de leur expérience était de remplacer l'une des bases de l'ADN de *E. coli*, la thymine, par un composant artificiel assez proche, le 5-chloro-uracile, et donc de changer la manière dont le vivant code ses gènes. Pour cela, ils ont cultivé une population de *E. coli* dans un milieu pouvant contenir de la thymine (milieu relaxant) ou du chloro-uracile (milieu stressant). L'alternance entre l'arrivée de ces deux milieux était contrôlée par une mesure dynamique de la turbidité de la population (la turbidité du milieu étant corrélée à la concentration en bactérie) : si la population passait en dessous d'un seuil fixé, on laissait relaxer la population avec de la thymine, au contraire, tant que la population se maintenait au-dessus du seuil, la pression de sélection était maintenue. Une adaptation à la chloro-uracile (normalement toxique) a ainsi été très vite observée (figure I-9) [64], après six mois, la population n'avait plus besoin d'apport en thymine et au contraire était devenue tributaire de la chloro-uracile. Les analyses génétiques ont montré que les bactéries avaient effectivement échangé ces deux bases nucléiques dans la constitution des nucléotides de leur ADN.

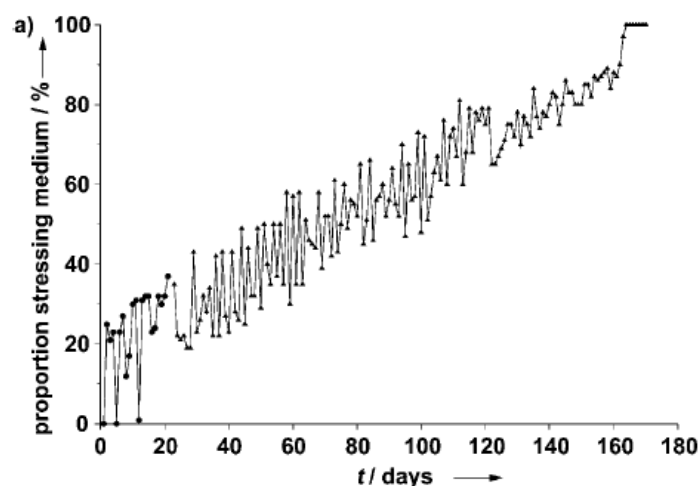


Figure I-9 : Evolution de la proportion de milieu stressant injecté dans le chemostat. La quantité de milieu stressant ajouté est fonction de la réponse de la culture au stress précédent : en cas de diminution de la population, le stress est diminué, si elle est au-dessus d'un certain seuil, le stress est augmenté. Ainsi, la mesure de cette proportion nous informe sur la réponse de la culture au stress. Nous voyons alors que la culture tolère de plus en plus le chloro-uracile et a de moins en moins besoin de thymine. L'évolution de cette culture est donc dirigée vers l'utilisation du chloro-uracile[64].

Si cette expérience d'évolution ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine de la xénobiologie, elle n'est néanmoins pas classique dans ses objectifs. Une approche beaucoup plus classique, beaucoup plus documentée et correspondant aux choix effectués dans cette thèse, est l'étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

I.2.C Stress antibiotique

La reproduction, et donc la valeur sélective des bactéries, peut être diminuée par différentes conditions de l'environnement, en particulier des agents chimiques : les antibiotiques, agents naturellement sécrétés par certains organismes pour se prévenir de l'invasion de bactéries dans leur niche écologique mais aussi, depuis leur découverte et leur appropriation par l'homme, agents de synthèse. Leur découverte révolutionna le traitement des maladies infectieuses au XXème siècle et a largement contribué à la baisse de la mortalité et au boom démographique de ces dernières décennies. Ils sont néanmoins au centre de nouveaux enjeux ces dernières années : leur utilisation massive et non raisonnée a dirigé l'évolution des souches bactériennes vers une résistance aux dits antibiotiques, réduisant ainsi leur efficacité à traiter les maladies infectieuses. Il y a donc un réel enjeu de santé public à comprendre l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

I.2.C.1 Action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés en deux catégories selon l'intensité de leur action :

- Les bactéricides : ce sont les antibiotiques qui éliminent les bactéries
- Les bactériostatiques : ces derniers vont stopper la croissance bactérienne, les bactéricides sont souvent bactériostatiques à faible concentration.

Nous pouvons aussi classer les modes d'action des antibiotiques en fonction de leur cible dans le cycle de vie cellulaire :

- **ADN** : certains antibiotiques peuvent altérer la réplication de l'ADN, soit en l'empêchant soit en la rendant suffisamment imparfaite pour que l'ADN répliqué ne soit pas viable (familles des nitrofuranes, des nitroimidazoles et des quinolones).
- **Synthèse des protéines** : certains antibiotiques peuvent cibler le ribosome et affecter sa capacité à synthétiser les protéines nécessaires au développement de la bactérie (familles des aminosides, des cyclines, des macrolides et des phénicolés).
- **Synthèse de la membrane cellulaire** : certains antibiotiques peuvent bloquer la synthèse de la paroi cellulaire alors que la bactérie va continuer à augmenter son volume interne. Ce mécanisme va conduire la cellule à « exploser » sous l'effet de la pression osmotique, c'est ce que l'on appelle la lyse (familles des bêta-lactamines et des glycopeptides).
- **Destruction de la membrane cellulaire** : certains antibiotiques peuvent provoquer la dégradation de la paroi extracellulaire et ainsi permettre une communication directe entre le milieu et le cytoplasme (exemple récent de la lysocine E).

Dans les deux derniers cas de figure, notons qu'il n'est pas forcément nécessaire à l'antibiotique de pouvoir pénétrer à l'intérieur de la bactérie pour agir, une bactérie doit donc pouvoir se prémunir des antibiotiques hors de son organisme. Les mécanismes de résistance entrant en jeu dans ces cas peuvent donc être partagés avec les autres bactéries du milieu, via la libération d'agents, par exemple neutralisant les antibiotiques dans le milieu. A l'inverse, un mécanisme de résistance interne à l'organisme sera plutôt privilégié dans le cas des actions d'antibiotiques à l'intérieur de la cellule.

I.2.C.2 La mesure de l'efficacité d'un antibiotique

L'action des antibiotiques sur un organisme est étudiée par la pharmacodynamie, cette dernière permet de déterminer l'activité et l'efficacité d'un antibiotique. Le but est généralement de déterminer la dose en antibiotique adaptée à un traitement, ce traitement ne consiste pas seulement en l'élimination des bactéries, il doit aussi éviter la possibilité d'un sous-dosage favorisant l'émergence d'une résistance à l'antibiotique. Le paramètre utilisé pour déterminer l'activité d'un antibiotique est sa concentration minimale pour inhiber la croissance bactérienne, c'est ce que l'on appelle la Concentration Minimale Inhibitrice (MIC). Nous pouvons donc mesurer l'activité bactéricide d'un antibiotique par la mesure de son MIC (figures I-10 et I-11), et réciproquement mesurer les capacités de résistance d'une population de bactéries à cet antibiotique par cette mesure.

Ce MIC peut être mesuré par différentes techniques. La plus classique est d'imposer un gradient de concentration en antibiotique sur une boîte de Pétri inoculée uniformément avec une souche bactérienne, d'observer après incubation les zones d'inhibition bactérienne et d'en déduire le MIC, qui correspond à la concentration en antibiotique à la frontière de la zone d'inhibition. Une autre technique consiste à préparer différents échantillons (liquide ou solide) à différentes concentrations en antibiotique, de les ensemercer et de mesurer la concentration minimale pour laquelle les bactéries ne vont pas croître.

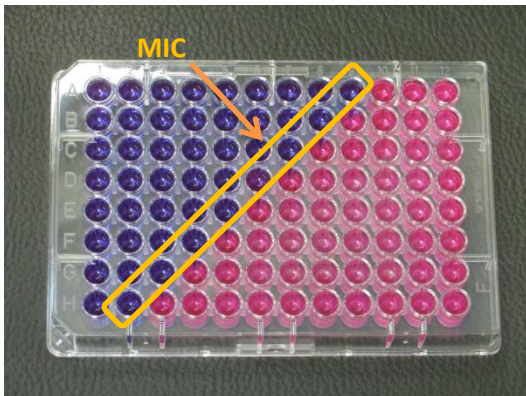


Figure I-10 : Protocole de mesure du MIC de *E. coli Aflu* pour la céfotaxime sur plaque 96 puits. La plaque est remplie avec 100 μ L de milieu dans chaque puits, sauf en A1. 100 μ L d'une solution de céfotaxime à 50mg/L a été introduite en A1 et B1. On effectue une dilution successive de 100 μ L de B1 dans C1, puis C1 dans D1, etc. 100 μ L est ajouté à chaque puits de la colonne 1. On dilue successivement la colonne 1 dans la 2, puis la 2 dans 3, etc. Nous obtenons un gradient exponentiel de puits à puits. On ajoute dans chaque puits 100 μ L de milieu avec de la résazurine et une concentration en bactéries de 1bactérie/ μ L. Après incubation de 24h, la résazurine (normalement bleue) devient rose en cas de croissance bactérienne. La concentration la plus basse de la diagonale de puits sans croissance nous donne le MIC. On mesure ici 0.05mg/L.

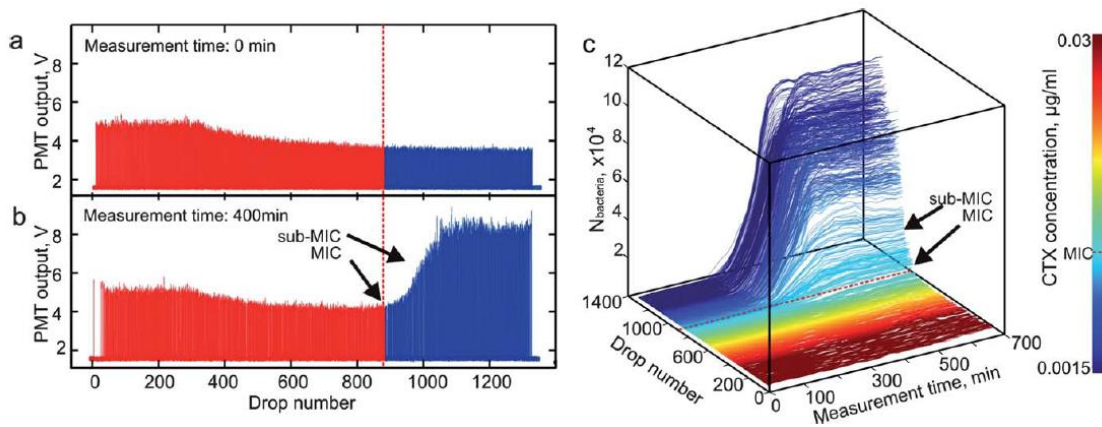


Figure I-11 : Mesure de MIC en millifluidique digitale. Un gradient de concentration en céfotaxime est appliqué au sein d'un « train » de gouttes de milieu contenant un inoculum de 10 bactéries par goutte. La croissance des gouttes est mesurée par fluorescence. Les gouttes où il n'y a pas de croissance donnent le MIC, soit 0.009 mg/L. [5]

Avec cette dernière méthode, on note que nous devons choisir quel nombre de bactéries nous devons introduire dans l'échantillon initial. Cette question s'est révélée importante car la valeur mesurée du MIC s'est avérée dépendre de la taille de la population initiale plus l'inoculum sera important, plus la valeur du MIC le sera. C'est ce qui est appelé l'effet d'Inoculum. L'existence de cet effet est encore à l'heure actuelle source de débat, mais plusieurs mécanismes bactériens « coopératifs » participent à l'explication de ce phénomène.

Nous savons tout d'abord que les bactéries peuvent communiquer entre elles en produisant et en détectant différents signaux chimiques : le Quorum-sensing. La densité d'une population va donc affecter la densité de signaux dans le milieu et donc modifier la probabilité pour qu'un individu capte un signal adéquat. Or, il est reconnu que certains comportements, comme l'activation d'un mécanisme de résistance à un antibiotique, peuvent être activés via le Quorum-sensing. Passé un seuil de concentration bactérienne, les bactéries pourraient donc se coordonner pour résister à un stress antibiotique, à condition qu'elles possèdent déjà l'habilité à y résister.

Les bactéries ont pu élaborer différents mécanismes de résistance, celles-ci sont toujours spécifiques à une famille donnée d'antibiotiques. Ces différentes stratégies de défense sont de quatre types. Les deux premières sont orientées vers l'antibiotique, les bactéries peuvent soit tenter d'inactiver l'antibiotique, soit l'expulser hors de l'organisme. Les deux autres tendent à protéger la cible de l'antibiotique, soit en la rendant inaccessible à l'antibiotique, soit en produisant une autre cible que va plus favorablement viser l'antibiotique et qui est neutre dans le métabolisme de la bactérie.

Mettre en œuvre un mécanisme de résistance présente un coût métabolique [97] et les bactéries vont donc croître moins vite et auront une valeur sélective moins forte. Une stratégie alors généralement adoptée par les bactéries est de maintenir plusieurs états phénotypiques dans la population, certains individus sacrifieraient ainsi leurs possibilités reproductrices pour le bien commun de la population. Plusieurs exemples de mécanismes sont ainsi connus. Les populations de *E. coli* sécrètent naturellement de l'indole, une molécule qui améliore la tolérance de la population au stress, et lorsqu'une population est mise en présence d'un antibiotique, les organismes les plus résistants vont sécréter beaucoup plus d'indole et ainsi aider l'ensemble de la population. D'une manière similaire, pour les antibiotiques pouvant agir de l'extérieur de la cellule, les bactéries peuvent sécréter des enzymes capables de détruire ces antibiotiques. Certaines bactéries peuvent être sacrifiées sous forme de biofilm protecteur, isolant la communauté du milieu exposé à l'antibiotique. Enfin, en dernier recours, la diversité phénotypique de la population permettra à certaines seulement de survivre (bactéries résistantes ou dormantes) et donc d'assurer le devenir de la population une fois le stress passé.

I.2.C.3 Antibiotiques et évolution expérimentale

Il est difficile pour une bactérie de trouver un chemin adaptatif vers une solution lui permettant de résister à une nouvelle famille d'antibiotiques (nouvelle au sens où la bactérie ne présente pas de résistance préalable à un autre antibiotique de la même famille), c'est pourquoi l'un des enjeux actuels de la microbiologie est de trouver de nouvelles familles d'antibiotiques. Nous avons vu que les bactéries peuvent se transférer des gènes via les plasmides (transfert horizontal) et c'est là l'un des principaux facteurs de l'émergence de bactéries multi-résistantes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressé au cas de figure où la bactérie est déjà résistante pour un antibiotique d'une famille donnée et nous avons voulu évaluer sa réponse à un antibiotique différent mais de la même famille.

Si une bactérie présente déjà un mécanisme de résistance à un antibiotique particulier, la sélection naturelle lui a permis de se spécialiser vis-à-vis de cet antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de sa résistance. Cette spécialisation rend, de prime abord, le mécanisme de résistance généralement assez peu efficace vis-à-vis d'autres antibiotiques très semblables mais légèrement différentes. Sous la pression du stress antibiotique auquel la bactérie ne serait pas parfaitement adaptée, la sélection naturelle pourrait favoriser les bactéries dont la spécialisation est moins efficace (mutations sur le gène de résistance) mais plus généraliste puis favoriser les bactéries témoignant une spécialisation nouvelle pour ce nouvel antibiotique. Ce chemin évolutif peut paraître grossier, mais il laisse une très grande flexibilité aux bactéries pour pouvoir s'adapter, beaucoup de mutations différentes peuvent modifier la spécialisation de la bactérie.

Si nous avons travaillé avec plusieurs couples d'antibiotiques dans notre travail, un seul fera l'objet de notre étude dans ce tapuscrit, un couple d'aminosides.

I.2.C.4 Les Aminosides : la Kanamycine et la Gentamicine

Dans cette famille, les antibiotiques agissent en se liant à la sous-unité 30S des ribosomes bactériens et en interférant ainsi sur la traduction de l'ARN messager. Le décodage des codons ne se fait alors pas sans erreur, entraînant des protéines souvent inactives (tronquées, non transcrites, ou ne correspondant pas à la protéine recherchée). La cellule n'est donc plus capable de synthétiser les protéines vitales, ce qui sera létal pour la cellule.

Les aminosides sont des molécules composées de plusieurs unités de sucres (2 à 5) substituées par des fonctions amines (d'où leur nom d'aminoglycoside). La plupart de ces antibiotiques sont construits autour d'un noyau central commun à la famille constitué de 2-déoxystreptamine et de glucosamine. Ils peuvent ensuite être classés en deux groupes en fonction de la position des sucres aminés substitués. Nous utilisons la Kanamycine et la Gentamicine qui sont deux molécules à la structure très proche du type aminoglycoside 4,6 disubstitué (figure I-12) :

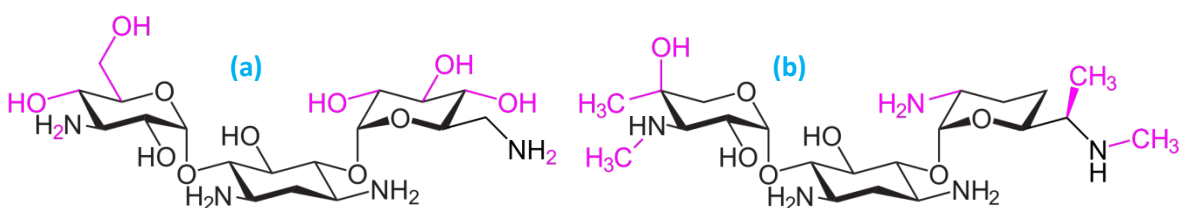


Figure I-12 : Différences structurales entre la Kanamycine (a) et la Gentamicine (b).

Le mécanisme de résistance le plus courant à ces antibiotiques consiste à inactiver le cycle désoxystreptamine par une enzyme. Ce mécanisme de résistance, comme tous ceux qui peuvent répondre à un stress par aminoside, est égoïste. Les MIC de notre souche *E. coli* Δ *fln* sont environ de 200mg/L pour la kanamycine et de 3mg/L pour la gentamicine.

L'expérience classique d'évolution pouvant être envisagée avec ce couple souche-antibiotique serait de chercher à transmuter la résistance à la kanamycine vers une résistance à la gentamicine. Une preuve d'évolution possible pour ces modèles biologiques a été réalisée en tube à essai sur un protocole

inspiré de ceux de Lenski et de Marlière, mais dans un cas de transfert en série (figure I-13). Nous avons ainsi pu observer une augmentation significative du MIC de la gentamicine, même si le MIC obtenu semble se stabiliser à une valeur inférieure au MIC de la kanamycine. La mesure du MIC de la kanamycine a par ailleurs diminué au cours de l'expérience, ce qui semblerait laisser penser que la souche en question a évolué vers une « dé-spécialisation » de son mécanisme de résistance antibiotique, mais elle n'a pas pu trouver de solution « spécialisante » à la résistance à la gentamicine ou pourrait être parvenue à une voie sans issue évolutive.

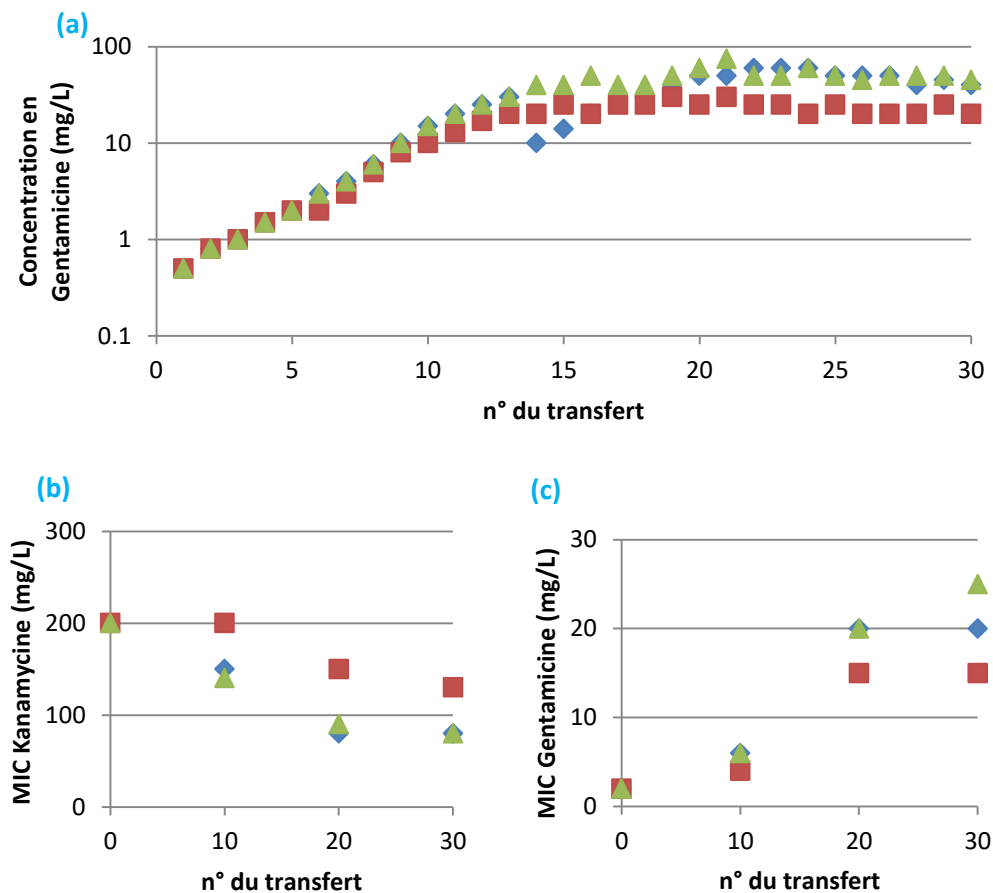


Figure I-13 : Adaptation de *E. coli Aflu* à la gentamicine. Nous avons réalisé des transferts en série sur 3 échantillons de 10 mL (milieu M9+G) en prélevant 100µL et inoculant un nouvel échantillon chaque jour. Nous avons commencé avec une concentration en gentamicine de 0.5 mg/L, chaque jour nous mesurons la densité optique de la dernière culture, si elle est supérieure à 1 nous augmentons de 50% (environ) la concentration en gentamicine pour l'échantillon suivant, sinon nous la diminuons de 30%. (a) Adaptation des cultures et atteinte d'un plateau. (b) Diminution de la résistance à la kanamycine observée tandis que (c) la résistance à la gentamicine augmente. Il semble que les trois cultures aient trouvé une solution rapide pour s'adapter à la gentamicine, aux dépens de leur résistance à la kanamycine, mais qu'elles ne soient plus capables de progresser à partir de ces mutations.

Cette expérience évolutive simple, si elle a permis de confirmer les possibilités adaptatives et évolutives de nos souches modèles quant à une pression de sélection par un nouvel antibiotique, a aussi mis en évidence la difficulté de faire évoluer une population vers un objectif précis. Le nombre de populations indépendantes ainsi que le nombre de lignées indépendantes dans chaque population peuvent conditionner la diversité de notre métapopulation et donc ses capacités évolutives globales. L'application détaillée des notions abordées au début de ce chapitre et appliquées au cas de l'évolution des bactéries par sélection artificielle fera l'objet de cette dernière partie de notre chapitre introductif.

I.3 Approches théoriques de la sélection artificielle et de la gestion de la diversité

Nous nous proposons dans cette partie d'abstraire les notions de sélection, de diversité, et de populations et de les adapter aux cas spécifiques de l'évolution de populations de *E. coli*. Pour cela, après avoir introduit les paramètres pertinents pour l'évolution de populations de *E. coli*, nous nous pencherons sur la question de la compétition interne aux populations puis entre populations. Notre objectif est, entre autres, de sélectionner des paramètres descriptifs de cultures multi-parallélisées pour choisir une technologie appropriée afin de maximiser la diversité de nos cultures et de les sélectionner artificiellement.

I.3.A Sélections sur les populations

Nous avons vu que trois types de sélections pouvaient influencer l'évolution d'une entité darwinienne : les sélections aléatoire, naturelle et artificielle. Ces trois formes de pression de sélection sont fixées par les conditions expérimentales mais peuvent potentiellement être modifiées en cours d'expérience. Si la pression de sélection totale va affecter la diversité d'une population (une augmentation du stress de sélection induit un effet d'étranglement sur la diversité), l'apport relatif de chaque pression va lui aussi l'affecter. En effet, selon la contribution relative de chaque type de sélection, nous serons dans un régime de sélection où un seul type peut dominer, et il doit exister un point d'équilibre des trois pressions de sélections. Nous avons choisi de représenter de manière simplifiée la contribution relative des pressions de sélection sous la forme d'un diagramme de phase (figure I-14), le point d'équilibre a été arbitrairement placé au centre du diagramme (sa position dépend de la manière dont est normalisée chacune des pressions de sélection).

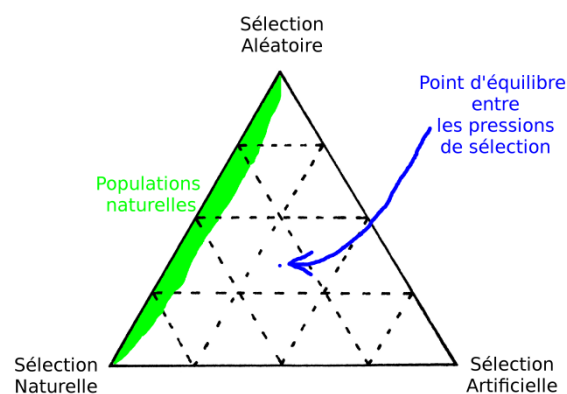


Figure I-14 : Proposition de représentation schématique des contributions relatives des trois types de sélection sur les populations. Le positionnement du point d'équilibre et des populations « naturelles » est arbitraire. Le but de cette représentation est de discuter de l'intérêt de jouer sur trois paramètres de pression de sélection pour diriger l'évolution d'une population.

A pression globale constante, augmenter la proportion d'un des types de sélection tend à rendre l'évolution directive, se placer dans des critères de sélection extrême semble donc réduire la diversité, qui est nécessaire à la viabilité à long terme d'un processus évolutif. Il semble donc plus intéressant que les trois types de sélection aient un impact du même ordre de grandeur pour pouvoir faire évoluer une population dans un sens voulu, car cela laisse plus de chemins évolutifs (de lignées différentes) en

compétition. Si notre représentation reste très simplifiée (elle ne permet pas de faire apparaître la pression de sélection globale, ni l'organisation de la métapopulation si la population est structurée), elle aide néanmoins à décrire la manière dont on peut diriger l'évolution d'une population.

Ces trois pressions de sélection ne sont pas équivalentes ni toutes indépendantes. En particulier, la sélection aléatoire peut intervenir lorsque l'une des deux autres pressions est assez forte : une sélection naturelle ou dirigée très contraignante va réduire la taille effective de la population qui va donc dériver génétiquement plus facilement. La population tend à s'adapter à une pression de sélection constante (naturelle ou artificielle), on observe donc une relaxation de cette pression de sélection et la population tend à nouveau à se diversifier en revenant vers le point d'équilibre. Mais selon l'intensité de cette pression, la population mettra un temps différent à relaxer, ainsi si l'on maintient une sélection constante (c'est à dire que la pression de sélection doit augmenter au fur et à mesure que la population s'adapte) la population pourrait ne pas relaxer vers l'état d'équilibre et dériver vers un état non recherché. Nous pouvons noter que cette relaxation de la pression n'est pas présente pour la sélection aléatoire, mais une forme de relaxation peut exister (on parle plutôt de résilience dans ce cas) si la population présente un mécanisme d'organisation interne favorisant la conservation de la diversité. Il s'agirait d'une sorte d'écosystème ou de structure sociale propre à la population, qui la rend plus résistante aux légères dérives mais qui présente une taille critique plus importante. C'est une stratégie adoptée par les populations polymorphes, mais aussi par les organismes multicellulaires.

Par exemple, l'élevage moderne tend à sélectionner artificiellement de manière intense et constante. La sélection naturelle est, elle, pratiquement inexistante. En effet, la viabilité naturelle (survie, reproduction) des individus ou de la population n'impacte pas leur capacité à transmettre leurs caractères. La population est donc piégée dans un état de diversité qui dérive de plus en plus, rendant de plus en plus inefficace la sélection artificielle. Fatalement, la population risque de converger vers une voie évolutive sans issue une fois qu'elle sera passée en deçà de sa taille critique, tout d'abord en n'arrivant ni à se diversifier ni à évoluer (cas des pur-sang), tout en finissant par fixer des tares génétiques jusqu'à devoir s'éteindre (figure I-15). Le principal défaut de ce mode d'élevage moderne est d'appliquer strictement sa sélection artificiellement sur les individus, favorisant la sélection aléatoire (il est difficile de sélectionner individuellement un pool génétique varié et donc une grande population), tout en mettant en compétition les différentes populations, ce qui conduit généralement à la perte des populations adaptées au contexte édaphique local, et réduit la diversité et les possibilités d'adaptations de la métapopulation [81].

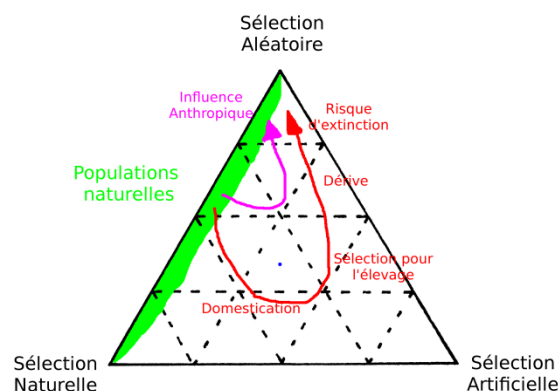


Figure I-15 : Schématisation de l'influence humaine comme vecteur involontaire de sélection artificielle. L'influence anthropique simple biaise l'écosystème et sélectionne involontairement des populations, qui perdent de leur diversité ainsi que leur taille, et sont de plus en plus soumises à la dérive. La domestication a eu un effet diversifiant tant que les populations étaient de grande taille et la sélection naturelle importante. La sélection stricte des individus tend à diminuer la diversité de la population et à la faire dériver jusqu'à l'extinction.

Dans le cas des individus asexués comme les bactéries, il est plus difficile d'éliminer efficacement les mutations délétères ainsi que de conserver une diversité importante dans une population homogène. L'accumulation des tares génétiques est donc très probable pour les petites populations, c'est ce que l'on nomme le « Cliquet de Muller ». La manipulation et la sélection sur les individus, d'une part ne sont pas aisées, mais elles constituent donc aussi une stratégie peu viable à long terme. A moins d'effectuer une sélection efficace multicritères (autant de critères que de traits ou gènes que l'individu doit conserver ou améliorer), ce qui signifie être capable d'évaluer et de sélectionner individuellement selon n critères une population plus grande que 2^n individus pour n très grand (donc irréalisable en pratique), la stratégie simple de sélection sur l'individu ne semble pas adaptée aux micro-organismes. En réalité, une bactérie présente un génome pratiquement identique à celui de la bactérie dont elle est issue (faible probabilité d'une mutation quelconque), ce qui permet aux sélectionneurs de se concentrer sur les caractères intéressants à améliorer et d'avoir le temps d'éliminer par la suite les potentielles dégénérescences. Mais dans les faits, cette technique serait très longue, l'improbabilité de modifier plusieurs caractéristiques en même temps implique une évolution lente sur une population de taille effective assez faible. La sélection sur « cellule unique » fait donc généralement appel à des mutagènes permettant d'accélérer considérablement le rythme des mutations et des diversifications, mais cette méthode nécessite de revenir à du criblage multicritère exhaustif pour ne pas aboutir à une bactérie de synthèse totalement inapte naturellement, voire pouvant manifester des effets nocifs. Ce n'est donc pas une stratégie permettant d'obtenir naturellement de bons candidats pour des applications durables dans l'agro-alimentaire, l'environnement, la santé, l'agriculture, etc.

C'est pourquoi, plutôt que d'imposer des pressions de sélections naturelles et artificielles à l'échelle de l'individu, nous nous proposons, en manipulant des populations et non des individus, de découpler ces deux pressions à deux échelles différentes et ainsi d'étudier et de mettre à profit plus efficacement l'évolution des populations de bactéries. Les populations sont des entités darwiniennes :

- elles peuvent se reproduire. Un échantillon prélevé dans une population peut former une nouvelle population dans un nouvel environnement. C'est donc la disponibilité d'un nouvel environnement qui est limitant pour la reproduction d'une population.
- leur descendance leur ressemble. En effet, il existe une corrélation très forte entre l'état de diversité phénotypique et génétique entre les deux populations, puisqu'elles sont composées des mêmes lignées d'individus.
- leur descendance varie. Si les individus tendent à varier légèrement entre eux, il en est de même de la population, à la différence que cette variabilité est moyennée sur la population, cette dernière va donc plutôt refléter la tendance globale des lignées. De plus, l'échantillon dont est issue la nouvelle population n'est pas nécessairement représentatif en toute exactitude de l'ensemble de la diversité de la population mère : il y a un effet fondateur.

Dans ce cadre, notre stratégie vis-à-vis des pressions de sélection serait de conditionner la sélection aléatoire par la taille minimale des populations, la sélection naturelle par les propriétés du milieu dans lequel se développe la population (ces conditions peuvent ainsi être artificielles, mais la sélection reste une compétition naturelle entre individus dans la population), et la sélection artificielle par la manipulation des populations, c'est à dire le conditionnement de la structure dynamique de la métapopulation (dans le cas le plus simple, éliminer selon un critère certaines populations, et donner les milieux ainsi libérés à d'autres populations).

Nous pouvons alors noter certains avantages à travailler avec des populations qui nous permettront de dégager des caractéristiques expérimentales :

- l'hérédité d'une population est conditionnée par l'étranglement de sa diversité lors du prélèvement de l'échantillon. En jouant sur la taille du goulot (« bottle neck ») nous pouvons donc affecter la variabilité des populations et donc influencer sur le processus évolutif.
- la variabilité individuelle et le bruit d'expression génique sont moyennés sur une population, ce qui permet de mesurer la tendance phénotypique moyenne. Nous sommes donc davantage certains de ce que nous sélectionnons.
- nous pouvons mélanger plusieurs échantillons et donner ainsi plusieurs parents à une population et mimer une forme de reproduction plus élaborée.
- nous pouvons sélectionner des mécanismes de réponse globale (de l'ensemble de la population qui s'organise pour s'adapter globalement) à une pression comme des stratégies sociales (coopération, symbiose, sélection de parentèle) ou dirigées (parcellisation des tâches).
- il nous est aussi permis de faire évoluer, non pas seulement chaque population indépendamment, mais une métapopulation, c'est à dire un groupe de populations dont la structure et les échanges sont contrôlés par l'expérience, structure pouvant évoluer. En effet, une population se développe dans un milieu de conditions homogènes, mais un tel système peut ne pas être assez complexe pour mimer un écosystème où les conditions et les niches sont multiples.

Deux points clef demeurent au cœur de ces stratégies d'évolution dirigée des populations: diversité, variabilité. Afin de conserver un maximum de chemins et d'opportunités évolutives, il est important de maximiser la diversité intra- et inter-populations. Afin de pouvoir effectuer une sélection pertinente, il est aussi critique de pouvoir observer une forme de variabilité héréditaire chez les populations filles. Si les différences observables entre populations et la gestion de leur diversité sont conditionnée directement par la stratégie de sélection artificielle (aucun processus aléatoire n'intervient sans être évalué), ce n'est pas le cas de la diversité interne à la population, qui est conditionnée de manière non triviale par les sélections naturelles et aléatoires.

I.3.B Gestion de la diversité et sélection intra-population

Nous nous proposons dans cette sous-partie de nous placer à l'échelle d'une lignée unique de populations homogènes, de définir le principe de reproduction des populations, de leur diversité interne et des différents paramètres affectant cette diversité, puis nous modéliserons simplement les caractéristiques, pertinentes pour l'évolution de la population, en fonction de ces paramètres et nous discuterons quelques stratégies de sélection naturelle par pression artificielle à l'intérieur de ces populations pour l'évolution dirigée.

Nous avons vu deux approches expérimentales de l'évolution microbologique : le chemostat et le serial transfer. Nous pourrions comparer ces deux approches vis-à-vis des populations comme deux stratégies d'adaptation différentes r/K par analogie avec les stratégies d'adaptation individuelle. Ainsi, le chemostat est une stratégie K , la durée de vie de la population est longue, il sera difficile de la paralléliser fortement et donc de la faire se reproduire en grand nombre, mais ces reproductions seront stables et auront peu de chance d'être éliminées. Cette stratégie correspond à la manipulation de populations déjà évoluées et qui doivent rester stables dans le temps. Par ailleurs, le serial transfer correspond à une stratégie r : faible durée de vie de la population, haute reproductibilité et parallélisabilité, beaucoup de descendants à éliminer à chaque génération. C'est la stratégie à adopter pour une population qui a un chemin évolutif important à effectuer et c'est donc la stratégie qui nous intéresse.

Nous avons étudié en détail, dans le cadre de la théorie de la coalescence [73], la manière dont la taille du bottle neck et le nombre de générations séparant deux transferts impactent la diversité d'une culture par transfert en série. Nous avons conclu que le descripteur le plus important de la diversité d'une population est le nombre de mutations différentes (acquise depuis sa compartimentation) qu'il présente à un moment donné. Ce patrimoine $P(t)$ est composé des mutations acquises depuis une durée égale au temps de coalescence qui varient comme $n_b \cdot \log(n_b)$, et des mutations fixées auparavant sur l'unique lignée ayant des descendants (proportionnel au temps et au taux de mutation). Le patrimoine d'une métapopulation NEM composée de N sous-populations transférées avec un bottle neck de n_b individus peut donc être approximé par une fonction affine du temps où son ordonnée à l'origine P_c est proportionnelle à $N \cdot n_b \cdot \log(n_b)$ et sa pente à N .

En jouant sur n_b et le nombre de générations séparant deux transferts, nous pouvons influencer sur la pression de sélection aléatoire. De même, nous savons qu'il est possible d'influer sur la pression de sélection naturelle, via la nature du milieu, mais cette influence n'est pas aussi facilement paramétrable, tout est question de la direction que nous souhaitons donner à l'évolution issue de la compétition à l'intérieur d'une population. Si nous ne pouvons universellement décrire la nature du stress, nous pouvons néanmoins décrire la manière de l'appliquer.

Le temps de coalescence est un facteur à prendre en compte lorsqu'une pression de sélection est imposée. Pendant cette durée, toutes les lignées de bactéries vont s'éteindre, sauf une qui va se diversifier en tout autant de nouvelles lignées. L'enjeu de la sélection naturelle est de s'assurer que la lignée choisie soit la plus adaptée, il faut donc que la pression de sélection donne à la bonne lignée une valeur sélective suffisamment significative pour ne pas être éliminée aléatoirement. Toutefois, cette pression doit être suffisamment faible pour ne pas trop diminuer la taille de la population, ce qui augmenterait la sélection aléatoire et diminuerait le temps de coalescence. Une stratégie naturelle pour lutter contre la coalescence est aussi une pression fluctuante ou divergente afin de favoriser la diversité.

I.3.C Sélection

Après avoir introduit la manipulation des pressions de sélection à l'intérieur des populations, nous pouvons nous intéresser à la sélection entre populations, c'est à dire la sélection qui est directement contrôlable par l'expérimentateur, c'est pourquoi, si dans les cas précédents nous parlions de pression aléatoire ou naturelle sous conditions artificielles, ici nous pouvons réellement parler de sélection artificielle.

Nous considérons toujours le cas simplifié d'une NEM, ce qui correspond au cas expérimental le plus usuel (n populations incubées en parallèle sans échange). La sélection artificielle consisterait à choisir dans les populations certaines qui pourront se reproduire, transférée dans un nouveau milieu, certaines qui ne le pourront pas, et certaines qui pourront accéder aux milieux libérés. Nous imposons donc un étranglement sur la collection de populations, une dérive contrôlée. Une analogie est dans une certaine mesure possible avec notre démarche de compréhension de la diversité interne d'une population. Nous pouvons aussi parler de bottle neck, de transfert, etc.

Le plus logique serait d'estimer le bottle-neck total maximal, c'est à dire le nombre maximal de lignées de populations qui pourraient être maintenues dans un tel système. Cette valeur peut être conditionnée par différentes limitations technologiques, humaines et temporelles, il faut, par exemple, réussir à analyser et sélectionner toutes les populations puis à en transférer en un temps qui doit être faible devant le temps d'incubation de la population (que l'on veut aussi petit que possible rappelons-le). Nous nommerons ainsi N_e le nombre maximal d'échantillons manipulables indépendamment par la technologie, c'est à dire le bottle-neck de populations. N_e sera le paramètre décrivant la sélectibilité d'un protocole.

Dans le prochain chapitre, nous explorerons les différentes technologies existantes utilisables pour travailler sur l'évolution des populations de bactéries. Nous les évaluerons elles-mêmes en fonction de leurs paramètres de diversité et de sélectibilité, ainsi que leurs potentiels développements, afin de choisir une technologie prometteuse et évolutive.

Chapitre II

Cultures de communautés de micro-organismes

II Culture de communautés de micro-organismes

Nous avons vu l'importance de la dérive génétique, du flux génique, des mutations et de la sélection dans l'évolution d'une métapopulation, en particulier de bactéries. Afin de diriger artificiellement l'évolution d'une telle population il est donc nécessaire de contrôler la structure de ses échanges, de s'assurer qu'un facteur discriminant et transmissible puisse exister afin que nous ayons la possibilité de sélectionner les sous-populations pertinentes, et d'en avoir la capacité. Mais il est essentiel de pouvoir manipuler des sous-populations dont la taille nous assure d'imposer une pression de sélection équilibrée entre sélections aléatoire et naturelle (nécessaire à une évolution durable), et dont le nombre nous assure d'imposer une pression de sélection artificielle adaptée sur ces sous-populations.

En effet, la taille des populations doit être suffisamment grande pour que ces dernières ne soient pas nécessairement soumises à la dérive génétique, mais aussi pour qu'elles puissent acquérir des caractères propres. Ces caractères peuvent être liés à l'organisation de la population, ou encore à l'apparition de mutations, événements rares dont l'augmentation de la taille de la population peut en faire des événements probables. Ce sont ces caractères qui peuvent entre autres modifier notre « lecture » de la population et aider à la décision de sélection artificielle. Dans ce cas, la taille des populations doit être suffisamment petite pour que ces événements ne soit pas systématiques et multiples dans chaque population. Dans le cas contraire, nous ne sélectionnerons pas un événement unique mais un ensemble de caractères moyennés, ce qui complexifie la discrimination des populations et n'assure pas la sélection du caractère voulu. Enfin, le nombre de populations dans la métapopulation doit être suffisamment grand pour toujours conserver une diversité inter-populations nous assurant d'une part, une diversité des individus et des organisations et d'autre part, d'explorer un grand nombre de chemins évolutifs. La multiplicité des organisations et de chemins stabilise en effet durablement la métapopulation et accroît les chances qu'elle réponde à notre objectif évolutif.

Les dimensions d'une métapopulation dirigée artificiellement sont conditionnées par les technologies de culture, d'analyse et de sélection employées. Ce chapitre a pour but de proposer une forme de technologie adaptée à la culture durable d'une métapopulation manipulable pour diriger son évolution, du point de vue de ses dimensions et donc de la dérive génétique. Dans une première partie, nous présenterons et comparerons les différentes techniques de cultures généralement employées en microbiologie afin de choisir une technologie prometteuse : la millifluidique. Nous ferons dans un second temps, l'état de l'art de cette technologie. Enfin, nous présenterons le dispositif expérimental élaboré pour répondre au mieux à la question de la gestion des diversités d'une métapopulation.

II.1 Technologies de cultures

Nous présenterons dans cette partie les technologies de cultures de micro-organismes généralement utilisées. Nous discuterons leur utilité dans le cas d'une expérience d'évolution dirigée par transfert en série et comparerons leurs paramètres de diversité et de sélectibilité respectives. Nous choisirons à cette issue une famille technologique de culture qui nous semble ainsi prometteuse pour la sélection artificielle des communautés de bactéries.

II.1.A Matrices de culture

Les micro-organismes sont cultivés en suspension dans un liquide, et présentent donc une certaine mobilité, ou sont fixés sur un substrat. Ce second mode de culture est la méthode classique utilisée en microbiologie et est plus proche de la plupart des conditions de cultures bidimensionnelles dites « naturelles » de bactéries, comme les bactéries du sol par exemple.

Le substrat en voie solide le plus répandu est la boîte de Pétri (figure II-1), une matrice semi-perméable constituée d'un gel d'agarose et de la plupart des constituants nécessaires à la croissance bactérienne. La culture de colonies de bactéries sur boîte (à partir d'un échantillon très dilué disséminé sur la surface du gel) est la méthode reconnue pour isoler des souches (pour constituer des échantillons monoclonaux), pour les identifier (par la forme de la colonie) et même pour étudier leur résistance à des conditions particulières (évaluation de la résistance à un antibiotique). En particulier, ce substrat facilite l'application de conditions hétérogènes et donc la culture de colonies diversifiées, mais complexifie la culture homogène de bactéries (chaque colonie consomme des nutriments et impose donc un gradient de concentrations dans le gel). Appliquer un gradient de concentration chimique en antibiotique est ainsi utilisé pour mesurer le MIC d'une bactérie pour un antibiotique donné ou encore pour effectuer des expériences d'évolution de lignées résistantes [5].

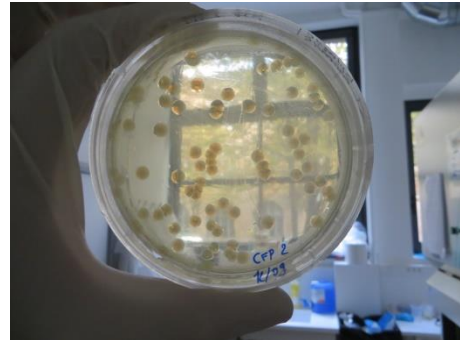


Figure II-1 : Culture classique en voie solide sur boîte de Pétri.

En voie liquide, une communauté de bactéries est cultivée en suspension dans un compartiment isolé dans des conditions relativement homogènes, avec ou sans agitation. Ce mode de culture se prête particulièrement au suivi des croissances de micro-organismes par voie optique d'absorption (densité optique DO liée à la turbidité du milieu) ou d'émission (si un constituant du milieu, biologique ou chimique, dont la concentration varie au cours de la croissance, est fluorescent). En voie liquide, les conditions appliquées à une colonie sont plus facilement contrôlables, la taille de compartiment et donc de la population le sont eux aussi dans une large gamme, contrairement à la voie solide. Les cultures en voie liquide sont plus facilement manipulables en grand nombre et automatisables, en particulier pour ce qui est du transfert d'individus entre deux cycles de culture. La voie liquide est d'ailleurs communément employée pour effectuer ce type de transfert par dilution entre deux cultures sur boîte de Pétri. Le stockage sur le long-terme de micro-organismes, par congélation, s'effectue aussi généralement en voie liquide. Enfin, toutes les opérations conventionnellement effectuées sur boîte peuvent être effectuées par voie liquide, que ce soit l'isolation de souche (par compartimentation d'un faible nombre d'individus selon une distribution de Poisson où $\lambda \ll 1$), l'identification (mesure de la courbe de croissance, observation au microscope, séquençage, etc.) ou la détermination du MIC (méthode des dilutions successives sur plaque multi-puits).

La culture en voie liquide semble donc à bien des égards adaptée aux cultures pour l'évolution dirigée et c'est celle que nous choisissons. Toutes les opérations de manipulations ou de mesures biologiques peuvent y être réalisées. Sa principale limitation est aussi son principal avantage : l'homogénéité interne aux compartiments liquides. La structuration spatiale naturelle des cultures en voie solide peut néanmoins être reproduite par la forte compartimentation des différentes cultures en voie liquide.

II.1.B Compartimentation en voie liquide

Des technologies très différentes existent pour la culture de micro-organismes en voie liquide. Nous présenterons ici les méthodes employées en les classant en fonction du volume des compartiments correspondants et nous discuterons de leur utilité pour la sélection artificielle des communautés de bactéries *E. coli* en évaluant leurs paramètres de diversité et de sélectibilité, ainsi que la facilité de les mettre en œuvre. Nous ne détaillerons ainsi pas avec minutie toutes les subtilités de ces techniques, nous ne discuterons que leur impact sur la métapopulation qui y serait cultivée. Nous avons retenu les catégories technologiques suivantes (figure II-2) :

- Les macro-réacteurs (>1L)
- Les éprouvettes (1mL-1L)
- Les plaques multi-puits (20μL-1mL)
- La microfluidique (10nL-50μL)
- La microfluidique (1pL-10nL)

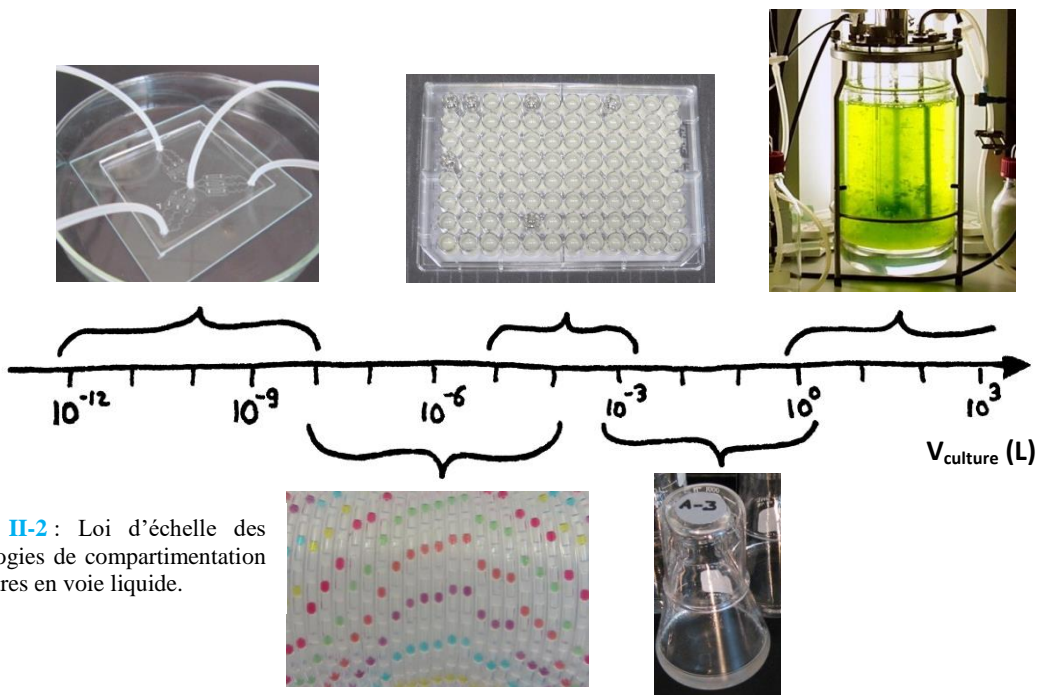


Figure II-2 : Loi d'échelle des technologies de compartimentation de cultures en voie liquide.

Nous avons choisi quelques paramètres de diversité et de sélectibilité pour comparer ces différentes technologies. Nous avons défini N_e , le nombre maximal d'échantillons manipulables indépendamment par la technologie, comme étant le paramètre de sélectibilité. Nous avons aussi défini $P(t)$ le patrimoine de la métapopulation à un instant t qui est décomposable sous la forme d'une fonction affine dont la pente, décrivant l'accumulation de mutations par l'ensemble des lignées uniques survivantes de chaque sous-population, est proportionnelle à N_e , et dont l'ordonnée à l'origine est le patrimoine en compétition avant la coalescence $N_e * P_c$ qui serait proportionnel à $N_e * n_b * \log(n_b)$, où n_b est la taille moyenne (en nombre d'individus) du transfert (bottle neck). En définitive, seuls deux paramètres sont pertinents pour conditionner l'évolution de la diversité par dérive génétique : N_e , qui est le paramètre le plus important pour accumuler des mutations, diversifier les populations et effectuer de la sélection artificielle, et $n_b * \log(n_b)$ qui décrit le nombre de mutations accessibles à chaque sous-population pour s'adapter ou du moins pour survivre sans être trop sensible à la dérive génétique. Nous effectuerons dans la suite une conversion des volumes vers les tailles de population en considérant une concentration en individus à saturation de 1 individu par pL.

II.1.B.1 Macro-réacteurs

Les macro-réacteurs sont des conteneurs importants où les conditions imposées à la population cultivée sont très contrôlées (température, pression, concentration en espèces chimiques ou biologiques) (figure II-3). Il s'agira généralement de chemostat (voir I-2). Il ne s'agit donc pas d'un mode de culture basé sur le transfert en série mais d'un conteneur fixe alimenté en continu et agité en continu. Les grands volumes entrant en jeu (jusqu'à la centaine de litres pour pratiquer l'évolution expérimentale, et jusqu'à plusieurs dizaines de mètres cubes pour une utilisation industrielle) fixent de très grandes populations. Cette technologie est donc adaptée à deux applications : des populations dérivant peu lorsque les conditions sont constantes (production industrielle) ou des populations pouvant supporter de très forts goulots d'étranglement lorsqu'une adaptation évolutive peu fréquente est recherchée.

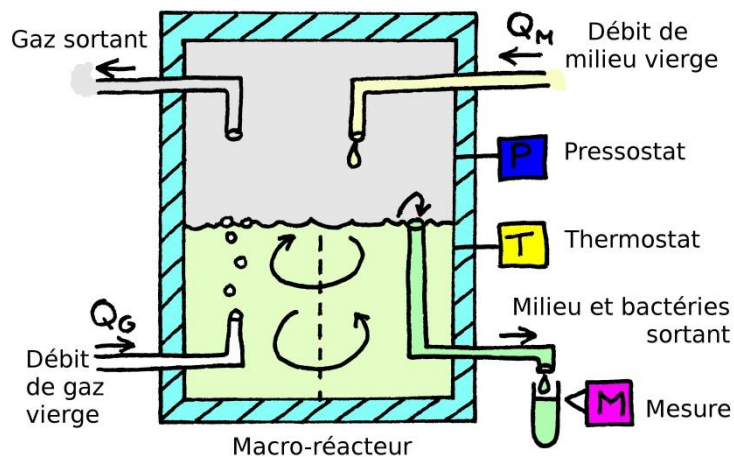


Figure II-3 : Schéma d'un macro-réacteur de type chemostat. Une population est cultivée de manière homogène dans des conditions stables assurées par l'apport de milieu et de gaz. Selon le débit de milieu, le bottle neck et le temps de division moyen seront plus ou moins faibles.

Par exemple, 1m^3 de milieu saturé en bactéries contient de l'ordre de 10^{15} bactéries, des mutations ou transformations très rares ont donc une bonne probabilité d'être représentées dans la population et de s'y fixer pour peu que la pression de sélection soit suffisamment forte. La diversité que peut maintenir un macro-réacteur est assez importante, les tailles des populations étant conséquentes et la taille du bottle neck étant du même ordre de grandeur.

Seulement, leur taille imposante, leur forte consommation en matériel et en ressource rendent ces réacteurs difficilement parallélisables à grande échelle. Les mesures chimiques et biologiques effectuées dans ces macro-réacteurs le sont généralement en sortie du réacteur, au niveau de l'excédent de culture évacué. Les mesures physiques sont internes au réacteur. Les conditions expérimentales peuvent ainsi facilement être dynamiquement corrigées en fonction de la réponse observée de la métapopulation. Néanmoins ces mesures sont moyennées sur la métapopulation et ne permettent pas de décrire rapidement les diversités de cette métapopulation.

La force, en termes de diversification, de cette technologie réside dans la taille des compartiments et non dans le nombre de compartiments. L'évolution dirigée via cette technologie se joue donc essentiellement sur les conditions artificielles de la compétition naturelle à l'intérieur de la population : les sélections aléatoires et artificielles ne sont pas des leviers sur lesquels nous pouvons facilement jouer. Si $N_e \sim 1$ est très faible, $n_b \cdot \log(n_b) > 10^{13}$.

II.1.B.2 Eprouvettes

Les éprouvettes, flasques, tubes à essai, falcon®, et autres récipients courants de laboratoires représentent les principaux outils les plus utilisés pour la culture de micro-organismes en voie liquide. Ils correspondent en effet aux volumes facilement manipulables par un expérimentateur (figure II-4). Il s'agit de conteneurs fermés et strictement isolés entre eux. Les conditions physiques de cultures comme la température, l'agitation ou l'exposition à la lumière sont conditionnées par l'incubateur dans lequel sont stockés les tubes, le temps de la culture. Les conditions chimiques et biologiques sont appliquées initialement avant fermeture des tubes, nous pouvons ainsi contrôler la composition et l'oxygénation initiales du milieu

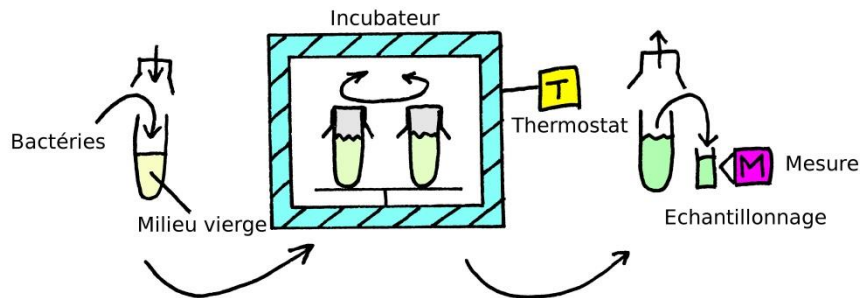


Figure II-4 : Protocole classique simplifié de culture et d'analyse ponctuelle d'une population bactérienne en éprouvette.

Les mesures effectuées sur la population peuvent être réalisées en continu si la transparence du tube le permet (mesure de DO ou de fluorescence peu précise), mais elles nécessitent généralement l'ouverture du tube et le prélèvement d'un échantillon pour analyse. Les transferts, la sélection et les analyses s'effectuent manuellement, ce qui limite le nombre d'échantillons analysables. Encore une fois, les tailles des populations sont suffisamment grandes pour préserver une certaine diversité microbiologique mais ni les analyses ni les prélèvements ne permettent d'avoir accès à cette diversité, à moins d'imposer un gradient de composition dans le milieu (une culture statique va ressentir un gradient d'oxygénation par exemple).

Les bottle necks appliqués à ces populations lors des transferts sont très variables mais sont conditionnés par la fréquence des transferts (journalière généralement à cause du facteur humain) et la taille des populations, mais elles n'excèdent pratiquement jamais le mL. Dans le cas de l'expérience de Lenski, $N_e = 12$ et $n_b * \log(n_b) = 3.10^7$, mais généralement nous avons $N_e \sim 10$ et $n_b * \log(n_b) < 10^{10}$.

II.1.B.3 Plaques multi-puits

Les plaques multi-puits sont des consommables de laboratoire standardisés pour l'analyse et la mesure de liquides. Ils permettent donc de suivre l'évolution de la DO ou de la fluorescence d'une culture de bactéries. Les différents modèles imposent les volumes entrant en jeu : les plaques 24, 96, 384 et 1536 puits correspondent à des volumes optimaux d'utilisation par puits de 1000, 200, 80 et 10 μL respectivement. Il s'agit donc de consommables destinés à la parallélisation des échantillons et des cultures, mais le nombre d'échantillons, c'est-à-dire finalement la taille de la métapopulation, est limité par le type de plaque utilisé : augmenter le nombre d'échantillons demande donc de multiplier le nombre de plaques manipulées en parallèles.

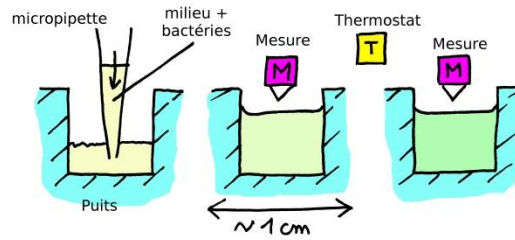


Figure II-5 : Protocole classique simplifié de culture et d'analyse en continu d'une population bactérienne sur plaque multi-puits. Les cultures sont particulièrement exposées (évaporation) et peu homogénéisées.

La culture en plaques multi-puits présente plusieurs désavantages (figure II-5) : il est difficile de mélanger efficacement ces conteneurs, le contenu de ceux-ci s'évapore le temps d'une culture, les conditions de culture (oxygénation, évaporation) sont hétérogènes sur une plaque et les cultures le sont tout autant. Il s'ensuit que le nombre total d'échantillons ou de cultures mesurés de manière fiable pour un transfert ou une sélection est beaucoup plus faible que le nombre de puits dans la plaque, nous observons en moyenne la nécessité d'effectuer au moins 4 répliquas de chaque culture pour espérer obtenir une culture fiable.

Le transfert entre deux plaques s'effectue par un fastidieux (et coûteux en consommables) pipetage d'un échantillon de chaque puits pour le diluer dans une nouvelle plaque. Cette opération peut souvent nécessiter une plaque intermédiaire dédiée à une dilution intermédiaire afin de ne pas introduire d'inoculum trop grand dans la nouvelle plaque. Toutes ces tâches, normalement limitées par le facteur humain, peuvent être automatisées à l'aide d'un robot manipulateur (pipeteur, analyseur) et accélérées [85]. Elles demeurent néanmoins coûteuses en matériel et consommable, limitées en terme d'échantillons, et extrêmement sensibles aux contaminations. En effet, des échanges entre puits et donc entre sous-populations sont possibles et difficiles à contrôler et des contaminations biologiques extérieures peuvent survenir : les conteneurs sont ici très exposés et il vaut mieux sur-échantillonner une sous-population pour s'assurer qu'elle ne s'éteigne pas.

Pour ces raisons, ce type de conteneurs est assez peu utilisé en tant que tel pour réaliser des expériences d'évolution, et sert essentiellement de conteneur intermédiaire ou d'analyse. Manuellement, les plaques 96 puits sont les plus utilisées, pour $N_e \sim 10$ et $n_b \cdot \log(n_b) < 10^5$. Nous avons $N_e < 10^3$ et $n_b \cdot \log(n_b) < 10^7$ en considérant l'utilisation de robots et d'analyses fiables.

II.1.B.4 Millifluidique

La millifluidique digitale consiste en la manipulation d'une émulsion de gouttes millimétriques hydrophiles isolées les unes des autres dans un fluide porteur hydrophobe. Ces gouttes sont généralement incubées sous forme de train de gouttes confinées dans un tube. Le volume des gouttes manipulées peut aller de la dizaine de nL [65] à quelques centaines de nL [5][65][50] mais ce volume n'est pas limité en soi. Le nombre de gouttes peut, lui, atteindre quelques milliers de gouttes, ces dernières sont récupérables sur plaque multi-puits où elles peuvent être diluées pour former un nouveau train de gouttes à partir de la plaque.

Les échantillons sont analysés en continu durant leur culture, leur comportement est homogène pour des conditions données (figure II-6) et il n'y a pas de contaminations extérieures en dehors de l'étape de transfert passant par une plaque multi-puits. Néanmoins de faibles échanges sont possibles entre gouttes durant l'incubation. L'étape de transfert est manuelle et donc limitante, car elle impose une longue incubation et est donc plus appropriée pour de faibles bottle necks et un nombre de gouttes

correspondant au nombre de puits de la plaque multi-puits. On peut considérer, dans l'état actuel de la technologie, que $N_e < 10^3$ et $n_b \cdot \log(n_b) < 10^5$. La microfluidique digitale, même si elle présente de nombreux avantages vis-à-vis de la culture sur plaque multi-puits, semble donc moins adaptée aux expériences d'évolution.

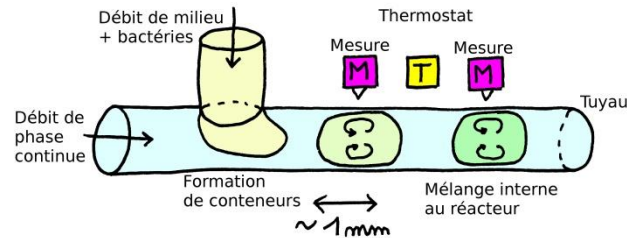


Figure II-6 : Protocole classique de compartimentalisation, de culture et d'analyse en continu d'une population bactérienne dans un tuyau millifluidique. Les réacteurs formés sont isolés et homogènes en interne et entre eux.

Néanmoins, cette technologie peut évoluer, contrairement aux plaques multi-puits. En effet cette technologie n'a pas atteint ses dimensions maximales et est limitée par une étape passant par une plaque multi-puits. Il doit exister un diamètre maximal de tubes (de l'ordre du millimètre) dans lesquels un train de gouttes pourrait être incubé, ces nouvelles dimensions permettent d'augmenter la taille des gouttes, celle du bottle neck ainsi que la longueur du train. En effet, la longueur maximale du train est conditionnée par la pression nécessaire pour le mettre en mouvement, pression qui diminue avec l'augmentation du diamètre du tube et la longueur du train. L'étape de transfert par une plaque multi-puits demeure limitante, mais nous pouvons effectuer les mêmes hypothèses de robotisation que nous avons faites pour les plaques multi-puits. Sous ces conditions, les valeurs espérées des paramètres seraient $N_e < 10^4$ et $n_b \cdot \log(n_b) < 10^6$, ce qui est plus prometteur.

II.1.B.5 Microfluidique

L'essor des techniques de microfabrication de ces dernières décennies permet de réaliser des puces microfluidiques vouées à la conception de gouttes d'émulsion, à leur stockage, leur analyse, leur incubation ou encore leur tri. En microfluidique digitale, à l'instar de la millifluidique digitale, les gouttes sont les compartiments réactionnels et les échantillons manipulés et mesurés (figure II-7). Leur conception se fait par le contrôle d'écoulements diphasiques dans des micro-canaux dont l'échelle caractéristique est de l'ordre de la dizaine de micromètre.

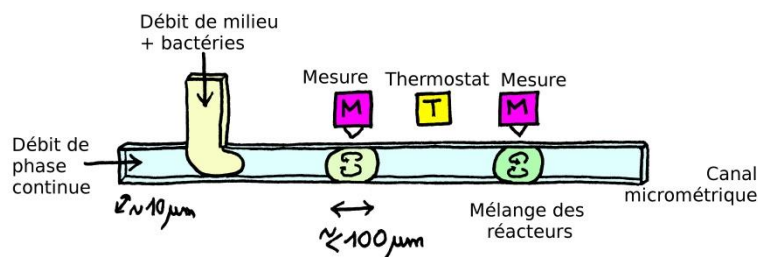


Figure II-7 : Protocole classique de compartimentalisation, de culture et d'analyse en continu d'une population bactérienne dans un canal microfluidique

Du point de vue de la culture de micro-organismes, plusieurs points distinguent la microfluidique de la millifluidique. Le volume des gouttes manipulées peut aller du pL à la dizaine de nL (100pL est l'ordre de grandeur typique), ce qui correspond à des populations de très petites tailles (moins de 10^4 individus). Le nombre de compartiments formés est, lui, très important, les gouttes sont formées à haut débit en continu, et c'est ainsi en dizaines de milliers que l'on peut compter les gouttes que l'on pourrait incuber dans une cavité bidimensionnelle, dite chambre microfluidique.

Tout comme la technologie millifluidique, il n'est pas encore possible actuellement de transférer, à l'intérieur d'un circuit microfluidique, un échantillon d'une population dans une nouvelle goutte de milieu. Il est donc aussi nécessaire de sortir et trier les gouttes sur un système externe, soit une plaque multi-puits, mais contrairement à la millifluidique digitale, il est ici très difficile de récupérer des gouttes micrométriques. De plus, des échanges sont aussi possibles entre gouttes, d'autant que les parois des dispositifs peuvent adsorber et ré-émettre des composés chimiques. Même si la technologie évoluait pour permettre d'effectuer des transferts contrôlés entre gouttes au sein d'un système microfluidique ou via un système externe, la taille des bottle necks serait nécessairement très petite, de l'ordre de quelques dizaines d'individus. Nous aurions donc $N_e > 10^4$ et $n_b * \log(n_b) < 10^2$.

III.1.C Une technologie pour l'évolution des populations

Nous avons exposé plusieurs conditions que doit respecter une technologie de culture de micro-organismes pour pouvoir cultiver une métapopulation (de type NEM ou de structure plus complexe) durablement tout en nous laissant la possibilité de la faire artificiellement évoluer :

Le nombre de sous-populations devrait être le plus grand possible, du moins suffisamment grand pour que nous puissions sélectionner ces sous-populations, c'est-à-dire choisir celles qui seront ou non transférées à la génération suivante de la métapopulation. La taille de la métapopulation influencera donc la taille du bottle neck que nous imposons sur la diversité inter-populations, et fixera donc avec quelle force nous pouvons guider l'évolution. Nous dirons donc, en ordre de grandeur, que $N_e > 10$ est au moins nécessaire pour commencer à parler de réelle sélection sur les populations.

La taille du bottle neck de chaque sous-population lors de l'étape de transfert doit être suffisamment grande pour conserver une bonne marge vis-à-vis de la dérive génétique tout en évitant de sélectionner un faible nombre d'individus car ce sont bien des populations que nous souhaitons propager et non des lignées individuelles. La technologie doit donc permettre $n_b * \log(n_b) > 10^3$.

Pour voir apparaître une forme de diversité (comme des mutations) au sein des sous-populations, il faut que ces mutations soient probables mais non systématiques. Nous souhaitons donc que quelques mutants puissent être disséminés dans la métapopulation et transférés, mais nous ne souhaitons pas que toutes les sous-populations contiennent un mutant. Nous souhaitons donc que $\mu * N_e * n_b * \log(n_b) > 1$ et $\mu * n_b * \log(n_b) < 1$, où μ est le taux de mutation d'une paire de base donnée par individu ($\mu \sim 10^{-9}$ pour *E. coli*).

Nous avons schématisé ces contraintes et le positionnement de chacune de ces technologies, espérées ou réelles, sur la figure II-8. Des cinq technologies, seules les cultures en tubes, en plaques multi-puits et en millifluidique digitale respectent ces conditions. La millifluidique digitale a l'avantage de pouvoir potentiellement bénéficier de développements technologiques lui permettant d'augmenter sa gamme de travail (par l'augmentation de N_e et n_b), tandis que les méthodes de culture en tubes ou en plaques ne peuvent accroître leur performances qu'en augmentant leur nombre, et ce, pour des performances potentielles plus faibles que la millifluidique digitale et des coûts proportionnels à la parallélisation de ces cultures.

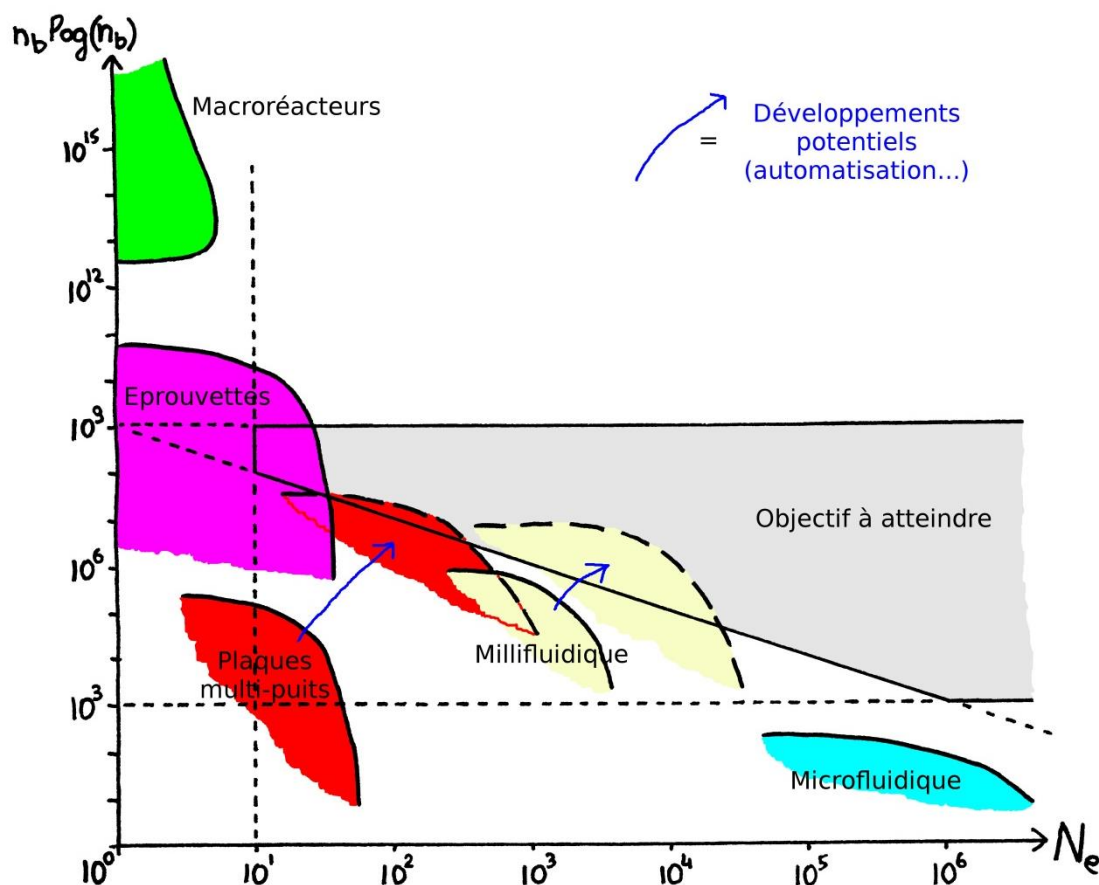


Figure II-8 : Diagramme comparant les différentes technologies de cultures selon leurs valeurs usuelles (en ordre de grandeur) de N_e et de $n_b \log(n_b)$. La multiparallélisation de ces cultures conduirait à translater ces frontières vers la droite. En revanche, il est possible de robotiser la culture en plaques multi-puits ou d'améliorer la technologie millifluidique, nous représentons les limites potentielles de ces améliorations. Nous avons proposé 4 conditions à remplir pour sélectionner artificiellement des populations de manière efficace, la zone grisée est celle où elles sont satisfaites. Nous voyons que seule la culture en éprouvette est actuellement adaptée, mais aussi que le développement de la millifluidique est encore plus prometteur car il maximise le nombre de cultures.

Si nous modifions les macro-réacteurs pour qu'ils respectent nos contraintes, nous n'en ferions que des tubes à essais à apport de milieu contrôlé et massivement parallélisés : nous nous rapportons donc à l'un des trois cas sélectionnés. De même, pour que la microfluidique digitale puisse respecter ces conditions, il nous faudrait augmenter la taille des gouttes manipulées, jusqu'à en faire une sorte de machinerie millifluidique micro-fabriquée.

La millifluidique digitale semble donc être la technologie la plus prometteuse pour cultiver une métapopulation stable dont nous pourrions diriger durablement l'évolution. Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons les éléments technologiques clés de ce mode de culture et d'analyse quantitative des populations microbiologiques, puis nous présenterons quelques modifications que nous y avons apportées pour qu'elles puissent mieux répondre aux conditions explicitées plus haut, même si elle reste néanmoins toujours dépendante d'une étape de transfert effectuée par le biais des plaques multi-puits. Nous présenterons à l'issue de cette thèse un perfectionnement de cette technologie qui permettra de nous en affranchir.

II.2 La boîte à outils millifluidique : état de l'art

Manipuler des fluides dans des dispositifs miniaturisés ouvre de nombreuses perspectives en recherche, en particulier dans les sciences analytiques où cela permet de réduire la taille des prélèvements à analyser et de multiplier les échantillons. La microfluidique s'est donc affirmée comme un outil précieux d'analyse. Ses applications en biologie furent naturelles [48] et permettent notamment de manipuler des cellules uniques, compte tenu du faible volume des gouttes en microfluidique digitale. La microfluidique permet une parallélisation massive des échantillons mais les outils de mesure et de contrôle des gouttes représentent l'encombrement et donc la limitation principale de ces systèmes. Les avantages de la compartimentation en biologie ont très vite été identifiés pour la microfluidique [88] et les techniques permettant de traiter indépendamment une très grande quantité de conteneurs se sont significativement améliorées ces vingt dernières années. Ce sont ces techniques, extrapolées vers des dimensions plus grandes, qui posèrent les bases de la millifluidique digitale.

Comme nous l'avons vu, la millifluidique digitale est plus adaptée à nos besoins : étudier des populations de micro-organismes et non des individus. Mais elle n'est pas non plus soumise à certaines des limitations de la microfluidique digitale : les systèmes sont plus réactifs (ce qui permet de manipuler les conteneurs facilement) et les conteneurs sont récupérables, ce qui est nécessaire à une expérience de type transfert en série.

Les dimensions des canaux millifluidiques sont de l'ordre du millimètre, ce qui ne requiert pas absolument la microfabrication de ces canaux. Nous utilisons donc des tuyaux commerciaux assemblés, démontables et facilement ré-agencables. Contrairement aux dispositifs microfluidiques, dont le mauvais fonctionnement d'une petite partie du circuit nécessite la re-fabrication complète du dispositif, un dispositif millifluidique est donc facilement réparable ou nettoyable (et présente moins de risque de se boucher ou de s'endommager). Ces dispositifs sont donc plus adaptés à des expériences sur le long terme.

La possibilité d'utiliser cette technologie pour phénotyper des populations de bactéries, mesurer des propriétés (MIC), ainsi que son aspect pratique, a poussé le laboratoire à développer à partir de 2006 un instrument d'analyse basé sur la millifluidique digitale [5]. Il s'agit d'un outil voué à incuber un millier de gouttes d'environ 400 nL, pouvant contenir des bactéries dans du milieu de culture, émulsifiées dans une phase continue d'huile fluorée. Ces gouttes sont organisées sous la forme d'un train de gouttes encadrées par des séparateurs, maintenu en mouvement dans un tuyau en polymère fluoré de diamètre interne 0.75mm. Les gouttes passent régulièrement devant un dispositif mesurant la fluorescence des gouttes. Cette mesure régulière de la fluorescence de chaque goutte nous assure de mesurer la dynamique de croissance de bactéries fluorescentes. Il est ainsi particulièrement adapté pour mesurer la dynamique de croissance d'une population issue d'un unique individu et dont les caractéristiques permettraient de le phénotyper. Cet instrument a beaucoup évolué [20][10] et nous présenterons dans cette partie les éléments classiques et pertinents de cette technologie. Cette technologie a divergé en 2015 entre le développement d'un pur instrument d'analyse, porté par la start-up Millidrop, et le développement d'un instrument orienté vers la perspective de l'évolution dirigée, porté par ce travail de thèse.

La technologie millifluidique utilisée peut être synthétisée en l'assemblage de quatre modules (figure II-9). Le cœur de l'instrument consiste en la manipulation/l'incubation du train de gouttes et à leur mesure, mais elle requiert de prime abord la génération dudit train de gouttes, et son évacuation par exemple via un tri des gouttes incubées en vue de leur récupération et de potentiellement reformer un

train de gouttes à partir de ces dernières. Nous présenterons et discuterons successivement dans cette partie ces différents modules : la manipulation, la génération, la mesure, puis le tri de gouttes dans le dispositif millifluidique classique.

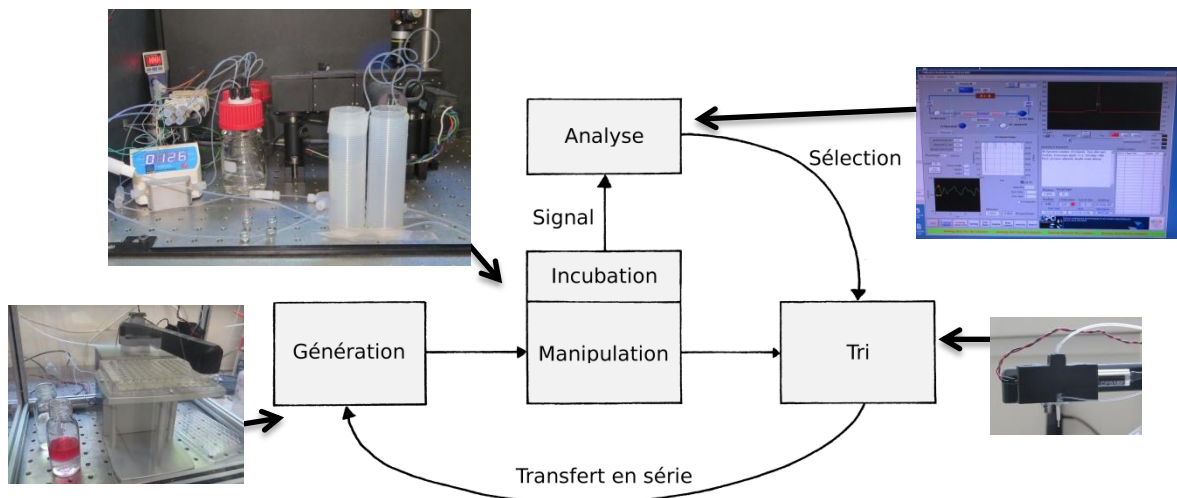


Figure II-9 : Schéma fonctionnel des quatre modules composant la technologie millifluidique développée par le laboratoire : un module de génération de goutte (pouvant être constitué d'un robot prélevant sur plaque 96 puits des échantillons qui vont être fractionnés en gouttes), un module de manipulation et incubation (constitué d'un long tuyau, aux extrémités duquel nous imposons une différence de pression, et d'un dispositif optique de mesure, dans une chambre thermostatée), un système d'analyse (ici le logiciel développé par le laboratoire) et d'un module de tri des gouttes (ici le robot de génération peut détecter les gouttes à l'extrémité du tuyau) sur plaque 96 puits après extraction du train et analyse (si sélection).

II.2.A Manipulation des réacteurs

Il existe de nombreuses méthodes pour manipuler des gouttes, notamment en microfluidique digitale où les échelles de tailles sont suffisamment petites pour que des forces autres que purement hydrodynamiques puissent entrer en jeu (pincés acoustiques, magnétiques, effet Marangoni)[99] mais ces méthodes sont soit propres à la géométrie (leur profil est rectangulaire) des canaux microfluidiques, soit non extrapolables à des gouttes de tailles plus grandes. C'est pourquoi l'application de flux hydrodynamiques est le procédé le plus utilisé en millifluidique, ainsi que le plus simple car la résistance des canaux y est beaucoup plus faible (équations II-1). Les pressions nécessaires pour mettre en mouvement un fluide y sont donc plus faibles, elles vont donc peu comprimer ou dilater les éléments compressibles ou élastiques du système (bulle de gaz, tuyau, canal) qui sera ainsi plus réactif (le régime transitoire hydrodynamique induit par une variation de différence de pression sera court).

$$\Delta P = R_h * Q \quad (a) \quad \text{où} \quad R_h = \frac{8\mu L}{\pi r^4} \quad (b)$$

Equations II-1 : Pour un écoulement stationnaire dans une conduite, la différence de pression ΔP entre les extrémités de la conduite induit un débit volumique Q de fluide qui lui est proportionnel (a) suivant un coefficient R_h , appelé la résistance hydraulique de la conduite. Dans le cas d'un écoulement d'un fluide monophasique incompressible en régime laminaire dans une conduite de section cylindrique, R_h nous est donné par (b) où r est le diamètre interne de la conduite, L sa longueur et μ la viscosité dynamique du fluide. L'exposant que porte r dans (b) conditionne l'influence de la taille du système sur l'hydrodynamique du fluide : diviser par 10 le rayon d'un tube, toutes choses égales par ailleurs, divise par 10^4 le débit à ΔP constant.

Les cultures de bactéries se faisant en milieu nutritif aqueux, nous souhaitons manipuler dans un tuyau des gouttes de solution aqueuse qui seraient les microréacteurs à incuber et analyser. Les propriétés de l'émulsion sont similaires en micro- et en millifluidique. En particulier, les compétitions entre les forces visqueuses, les forces d'inertie, les forces de gravitation et les forces de surface ne sont pas modifiées (équations II-2). Quelques nombres sans dimensions permettent ainsi de décrire certaines caractéristiques du train de gouttes en comparant ces différentes forces. Dans les deux cas, le régime de l'écoulement est définitivement laminaire tandis que cet écoulement n'est pas suffisant pour déformer les gouttes, les forces de surface étant dominantes, dans des conditions normales (écoulement simple dans un tuyau). Néanmoins nous observons que la gravité commence légèrement à se faire sentir en millifluidique dont la taille caractéristique s'approche de la longueur capillaire ($l_c = 2.4\text{mm}$).

$$R_e = \frac{Vr\rho}{\mu} \quad (a) \quad C_a = \frac{V\mu}{\gamma} \quad (b) \quad B_o = \left(\frac{r}{l_c}\right)^2 \quad (c) \quad l_c = \sqrt{\frac{\gamma}{g\Delta\rho}} \quad (d)$$

Equations II-2 : (a) Le nombre de Reynolds R_e représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses. Il décrit la nature du régime d'un écoulement (laminaire, transitoire, turbulent). (b) Le nombre capillaire C_a représente le rapport entre les forces visqueuses et la tension superficielle. (c) Le nombre de Bond B_o représente le rapport entre les forces gravitationnelles et la tension de surface. (d) Il peut être déduit de la longueur capillaire l_c , la longueur caractéristique d'équilibre des forces de pesanteur et de tension superficielle. Où V est la vitesse moyenne du fluide, r le rayon du canal, ρ la masse volumique du fluide porteur, μ la viscosité dynamique la plus grande (ici du fluide porteur), γ la tension superficielle entre les deux phases, et $\Delta\rho$ la différence de masse volumique entre les deux phases. Dans le cas d'une émulsion de gouttes (distance 10^3r parcourue en une seconde) confinées d'eau dans de l'huile fluorée FC40 ($\rho = 1855 \text{ kg/m}^3$, $\mu = 4 \text{ m}^2/\text{s}$ et $\gamma = 44 \text{ mN/m}$ à 20°C), nous pouvons calculer pour un canal microfluidique ($r = 25\mu\text{m}$) $R_e = 3.10^{-3}$, $C_a = 2.10^{-5}$, $B_o = 1.10^{-4}$ et $l_c = 2.3\text{mm}$ et pour un canal millifluidique ($r = 375\mu\text{m}$) $R_e = 0.5$, $C_a = 3.10^{-4}$ et $B_o = 0.02$. Nous sommes dans les deux cas en régime laminaire, avec des forces d'inertie dominées par les forces visqueuses, elles-mêmes dominées par les forces de tension superficielle. Toutefois, si l'effet de la gravité est négligeable en microfluidique, elle commence à se faire sentir en millifluidique à mesure que nous nous approchons de l_c .

La manipulation des réacteurs est par contrôle de pression, c'est-à-dire que nous imposons à l'ensemble du train de gouttes une vitesse qui fera défiler les gouttes devant un détecteur de fluorescence. Afin de toujours conserver le train de gouttes à l'intérieur du tuyau, nous lui imposons un mouvement de va-et-vient devant le détecteur. Si ce mouvement pourrait être imposé par un pousse-seringue, il est dans notre cas toujours imposé par une différence de pression entre deux réservoirs de phase continue connectés à chaque extrémité du tuyau. Nous appliquons alternativement, en synchronisation avec le déplacement du train, une surpression de quelques centaines de millibars dans l'un ou l'autre réservoir tandis que l'autre est à pression atmosphérique, les allers et retours des gouttes sont ainsi assurés (figure II-10).

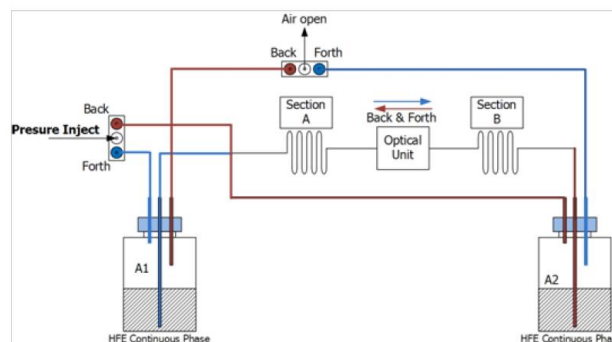


Figure II-10 : Schéma du dispositif permettant d'incuber les cultures en gouttes. Le sens du mouvement du train nous est donné par l'une des deux configurations : « Back » ou « Forth ». Cette configuration est fixée par l'activation des électrovannes reliant, par exemple en Forth le réservoir de phase continue A1 à la pression, et A2 à l'air ambiant. (schéma réalisé par Yuxing Wang)

II.2.A.1 Indépendance des réacteurs

Afin de garantir l'indépendance et la traçabilité des réacteurs que nous manipulons, nous devons nous assurer qu'ils ne libèrent pas de matière et qu'ils restent ordonnés dans le tuyau. La traçabilité est garantie par leur confinement : si les gouttes sont contraintes par la paroi du tuyau, et que le rayon de celui-ci n'est pas grand devant l_c , les gouttes ne pourront pas se déformer pour échanger leurs positions. L'indépendance des réacteurs est garantie par la phase continue : tant que le train est en mouvement, un film de lubrification isole les réacteurs de la paroi du tuyau, ce qui limite les échanges entre réacteurs provoqués par le mouillage des gouttes sur cette paroi. L'épaisseur du film de lubrification e_l nous est donnée par l'équation II-3 [13][46], l'existence de ce film traduit l'équilibre entre l'entraînement visqueux du fluide sur la paroi et la pression capillaire de la goutte.

$$\varepsilon = \frac{e_l}{r} = F \left(\lambda = \frac{\mu_g}{\mu_c}, C_a \right) * C_a^{2/3}$$

Equations II-3 : Ratio ε de l'épaisseur du film de lubrification e_l séparant une goutte de la paroi d'un tuyau cylindrique sur le rayon de ce tuyau, pour une goutte de viscosité μ_g en mouvement dans une phase continue de viscosité μ_c et de nombre capillaire C_a . La fonction F est une fonction correctrice adimensionnée, de valeur proche de l'unité, dépendante de λ (le ratio des viscosités) et de C_a . Nous sommes dans un régime de gouttes de faible viscosité ($\lambda\sqrt{\varepsilon} \ll 1$) où $F = F_0 \approx 1.337$ [46], nous calculons ainsi pour $C_a = 3.10^{-4}$ (voir eq.II2) $e_l \approx 2\mu\text{m}$ dans un canal millifluidique, soit $\varepsilon = 0.6\%$ et on peut vérifier que $\sqrt{\varepsilon} \approx 0.02 \ll 1$.

De plus, pour s'assurer que les gouttes ne mouillent pas la surface du tuyau, nous choisissons un fluide porteur et un type de tuyau dont la composition défavorise l'existence d'une interface paroi-eau par rapport aux existences d'une surface paroi-phase continue et d'une surface phase continue-eau (l'équation II-4 doit être vérifiée). Nous avons ainsi choisi de travailler avec des tuyaux en polymères fluorés (figure II-11) qui sont particulièrement hydrophobes et avec l'huile fluorée FC40 commercialisée par 3M™, un mélange de deux perfluorocarbures.

$$\gamma_{gp} > \gamma_{gc} + \gamma_{cp}$$

Equations II-4 : Condition à vérifier sur les tensions superficielles goutte-paroi γ_{gp} , goutte-phase continue γ_{gc} et phase continue-paroi γ_{cp} pour que les gouttes ne soient pas susceptibles de mouiller la paroi.

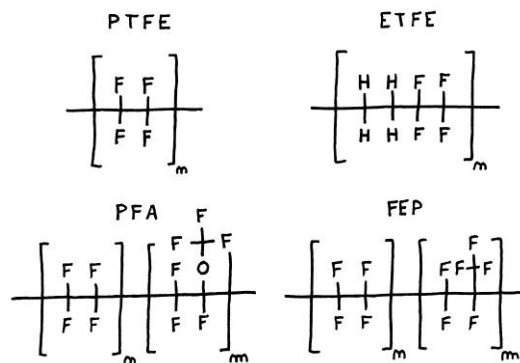


Figure II-11 : Composition des différents polymères fluorés utilisés en millifluidique. Le PTFE est le plus hydrophobe, l'ETFE s'usine facilement, le PFA et le FEP ont de bonnes propriétés optiques mais le FEP est plus résistant.

II.2.A.2 Traçabilité des réacteurs

Afin de s'assurer de la traçabilité des gouttes d'un train, nous devons non seulement nous assurer qu'elles n'invertissent pas leurs positions (confinement) mais aussi qu'elles ne vont pas fusionner. Dans le cas d'une émulsion simple de gouttes d'eau dans l'huile fluorée, les gouttes d'eau sont séparées entre elles par des poches d'huile fluorée (figure II-12). Leur longueur est initialement suffisamment grande pour que les gouttes ne soient pas en contact. Lors du mouvement du train, de l'huile est échangée entre les différentes poches, de manière irréversible et indépendamment du volume des poches. Ces échanges peuvent légèrement fluctuer et donc modifier irréversiblement le volume des poches. La vitesse des gouttes est légèrement plus élevée que celle de la phase continue et ce gain de vitesse dépend de la vitesse locale de la goutte dans le tuyau [6], de faibles variations locales des propriétés physiques ou géométrique peuvent ainsi engendrer de petites fluctuations dans les échanges entre poches. Aucun mécanisme ne permet de réguler le volume de ces poches, le volume de ces dernières va donc diverger du volume initial. En dessous d'un volume critique des poches de l'ordre de $2r^3$, deux gouttes pourront entrer en contact et potentiellement fusionner. L'ajout d'un tensioactif peut limiter le risque de fusion au contact mais cela ne l'élimine pas, d'autant qu'il sera difficile de distinguer deux gouttes proches lors de nos mesures [10]. Espacer considérablement les gouttes permettrait d'assurer que le volume des poches ne soit jamais nul, mais cette solution affecte la performance de cet outil en réduisant le nombre d'échantillons manipulés.

Pour forcer les gouttes à rester éloignées les unes des autres, nous devons donc insérer dans les poches un élément dont le volume ne pourra pas passer en deçà du volume critique pouvant déclencher la coalescence entre deux gouttes. Cet élément, ce séparateur (ou « spacer »), devra donc être immiscible avec les deux phases en présence, aqueuse et fluorée.

La première solution développée par le laboratoire est l'ajout d'une goutte d'huile minérale entre chaque réacteur [5][10]. Cette solution fut privilégiée car l'huile est totalement immiscible et insoluble dans les deux phases, de plus elle est incompressible, ce qui augmente la réactivité du train, facilite sa fabrication et assure une vitesse constante entre gouttes et au cours du temps. Seulement, cette huile ne peut être utilisée qu'en présence d'un tensioactif. En effet, l'énergie de surface huile minérale – FC40 est très faible (4mN/m) tandis que celle entre l'eau et l'huile minérale est plus faible que γ_{ge} , une grande surface de contact va donc apparaître entre les deux phases dispersées, et une encapsulation de gouttes d'eau dans l'huile minérale est possible. Pour résoudre cette difficulté, il faut utiliser un tensioactif spécifique de l'interface eau-FC40 qui va abaisser la tension superficielle correspondante et la stabiliser.

Cette première solution présente plusieurs défauts importants. Tout d'abord l'usage d'un tensioactif est contraignant : les coûts sont élevés, il rend difficile le recyclage de l'huile fluorée (dont la concentration en tensioactif va diminuer au fil des utilisations) et il diminue la fusion entre gouttes, ce qui rend les gouttes libres peu labiles et limite certaines perspectives de la technologie (comme celle d'ajouter des composés aux gouttes à l'intérieur du système [36]). La limitation principale de cette solution est qu'elle n'isole pas parfaitement les réacteurs : le séparateur peut ponctionner un échantillon d'une goutte voisine lors du changement de direction du train et la libérer, certains micro-organismes peuvent croître hors du réacteur en passant par l'huile minérale et coloniser les gouttes voisines (ce peut être le cas des champignons filamenteux ou des biofilms bactériens par exemple).

Pour ces différentes raisons, l'utilisation des séparateurs sous forme de gouttes d'huile minérale avait été écartée par le laboratoire peu avant le début de mon travail de thèse et avait été remplacée par un mode de séparation plus courant : les bulles d'air [25]. L'air en tant que séparateur a notamment été utilisé à l'origine par les sciences analytiques [91]. Compressibles et très solubles dans l'huile fluorée, ces nouveaux séparateurs modifient la dynamique du train et sa formation. Leur taille va diminuer durant

l'incubation de par la respiration des bactéries, la pression appliquée et leur solubilisation (voir le chapitre IV).

II.2.A.3 Mouvement d'un train de gouttes

L'équation II-1 décrit bien le mouvement d'un fluide newtonien laminaire incompressible où la vitesse du fluide est directement proportionnelle à la différence de pression appliquée. En micro- et millifluidique digitale, la physique du système est plus délicate. La pression, en particulier, n'est pas uniforme dans la section d'un tuyau parcouru par un écoulement poly-phasique. Plusieurs points de vue permettent de calculer la variation de la pression le long d'un tuyau parcouru par des gouttes confinées dans un fluide continu [6]. Dans celui où nous suivons l'évolution de la pression le long de l'axe de révolution du tuyau (donc en traversant les gouttes), nous pouvons considérer par approximation que la variation de pression suit localement l'équation II-1 à l'intérieur des poches, gouttes et séparateurs, mais une discontinuité de pression est à prendre en compte au niveau des interfaces entre les phases. Cette discontinuité est causée d'une part par la pression capillaire (qui n'impacte pas la pression globale du train) et d'autre part par un gap de pression supplémentaire causé par une asymétrie de la courbure de l'interface de l'élément (entre l'avant et l'arrière). La pression capillaire augmente seulement la pression interne de l'élément confiné d'une valeur $\Delta P = 2\gamma/r$ où r est le rayon interne du tuyau et γ la tension superficielle entre l'élément et la phase continue. La différence de pression totale appliquée au train peut alors se calculer via les équations II-5 et son profil peut être visualisé sur la figure II-12 [53][6].

$$\Delta P_{\text{élément}} = 7.45 \frac{\gamma}{r} C_a^{2/3} + \frac{8\mu LV}{r^2} \quad (a) \quad \Delta P_{\text{poche}} = \frac{8\mu_c L_p V}{r^2} \quad (b)$$

$$\Delta P_{\text{train}} = n_{\text{poche}} * \Delta P_{\text{poche}} + n_{\text{goutte}} * \Delta P_{\text{goutte}} + n_{\text{séparateur}} * \Delta P_{\text{séparateur}} \quad (c)$$

Equations II-5 : Sous l'hypothèse d'un écoulement incompressible, d'éléments confinés non compacts (goutte ou bulle) de tension superficielle γ confinés dans un tuyau de rayon interne r . (a) Différence de pression causée par la présence d'un élément confiné de longueur L , de viscosité μ , de vitesse V . Le premier terme correspond à l'asymétrie de la courbure de l'interface [53] tandis que le second terme manifeste la perte de charge causée par l'élément (calculée à partir de l'équation II-1). (b) Perte de charge causée par une poche de phase continue de longueur L_p et de viscosité μ_c . (c) la perte de charge totale du train est la somme des pertes de charge relatives au total des poches, gouttes et séparateurs.

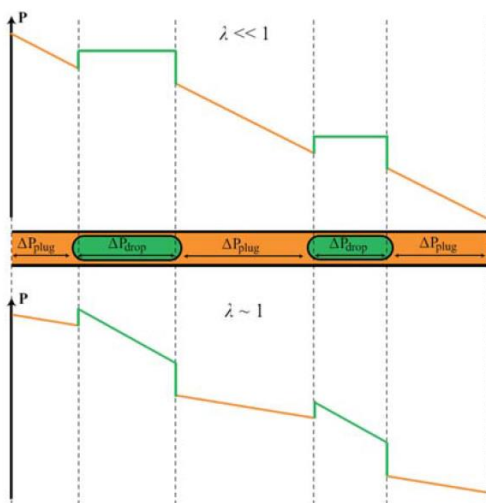


Figure II-12 : Représentation qualitative de la pression le long d'un tuyau contenant des éléments immiscibles en mouvement dans une phase continue et séparés par des poches de fluide porteur [6].

En haut, λ est petit devant 1. L'élément présente donc une très faible viscosité par rapport à celle de la phase continue, c'est pourquoi le gradient de pression est plus fort dans les poches que dans les éléments. Il s'agit typiquement de bulles d'air.

En bas, λ est légèrement supérieur à 1. Il s'agit du cas d'une goutte visqueuse comme un séparateur d'huile.

Dans le cas de gouttes d'eau, le gradient de pression serait un peu plus faible que celui dans les poches ($\lambda=0.3$)

Dans le cas d'un train compressible, où les séparateurs sont des bulles d'air, cette équation approche la réalité dans la limite d'une faible différence de pression appliquée au train ($\Delta P_{train} \ll P_{aval}$, la pression appliquée en aval du flux, soit généralement la pression atmosphérique) mais cette condition n'est jamais rencontrée à moins de travailler sur des trains très courts. Cette équation reste vraie à des différences de pression plus élevées, à condition de la corriger à tout instant et de considérer que la perte de charge créée par un élément dépend de sa position dans le train et du temps. En effet, les bulles d'air, compressibles, vont être comprimées ou dilatées en fonction de la pression hydraulique qu'elles subissent, suivant la loi des gaz parfaits. Le train se déplace des fortes pressions vers les basses pressions, les bulles vont donc se dilater au fur et à mesure du déplacement du train, les bulles en aval étant plus dilatées que les bulles en amont du train. Pour se dilater, les bulles d'air doivent imposer une pression au train en aval de leur position : la goutte qui précède une bulle doit avancer moins vite que la goutte qui la suit pour que le volume séparant les deux gouttes puisse croître. Il s'ensuit que toutes les gouttes n'avancent pas à la même vitesse et qu'elles accélèrent. En conséquence, la perte de charge de chaque élément est aussi accrue : la vitesse, et donc le nombre capillaire, l'épaisseur du film de lubrification ainsi que la longueur des éléments augmentent. En contrepartie, la longueur totale des poches de phase continue diminue, ce qui tend à diminuer la perte de charge totale. Nous observons finalement une diminution globale de la perte de charge et une accélération effective de l'ensemble du train.

Cette différence de vitesse entre l'avant et l'arrière du train peut rendre les flux inter-poches asymétriques. En effet, l'épaisseur du film de lubrification est plus importante à l'avant qu'à l'arrière du train, il y a donc un flux de phase continue entrant dans le train de gouttes (à l'avant) légèrement plus important que le flux de phase continue sortant (à l'arrière du train) (figure II-13). Les poches situées aux extrémités internes du train ont donc tendance à croître au cours d'une incubation. On observe en effet un étalement des gouttes du train au cours du temps : la longueur du train augmente. Il s'agit d'un des facteurs de vieillissement du train, en plus de la diminution de la taille de séparateurs.

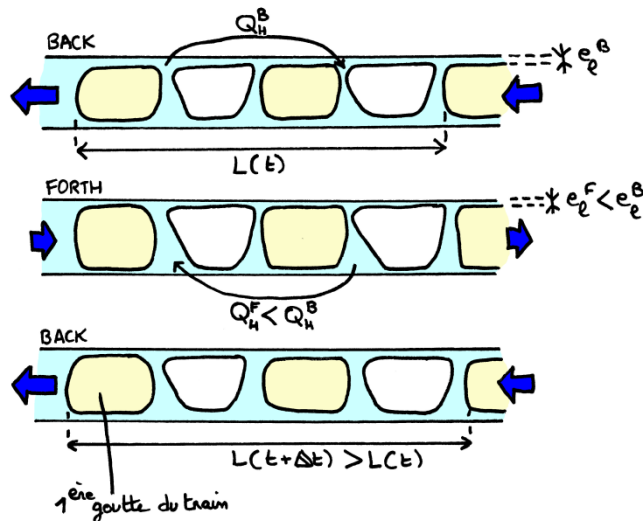


Figure II-13 : Schéma du comportement d'une extrémité du train de gouttes.

En mouvement Back, cette extrémité du train avance plus rapidement que l'autre extrémité, le film de lubrification est plus épais et le débit de phase continue entrant est plus fort que celui sortant à l'autre extrémité : la phase continue se stocke dans le train.

Lorsque l'on inverse la direction (Forth), le débit de phase continue sortant du train n'est pas suffisant pour retirer l'excédent stocké précédemment car cette partie du train avance désormais moins vite.

Bilan : la quantité de phase continue augmente dans le train, ce dernier s'étale donc.

De plus, la variation des vitesses des gouttes le long du train n'est pas nécessairement monotone : nous avons pu observer des ondes de pression se propager au sein du train. Cet effet peut s'expliquer par le temps de mise en mouvement d'une goutte à une différence de pression : à basse vitesse, une goutte oppose une résistance plus forte à la différence de pression entre les gouttes qui l'encadrent, cette dernière peut donc devenir relativement élevée avant que la goutte ne se mette en mouvement, opposant ainsi une

résistance moins grande à la différence de pression ; une fois la bulle en aval suffisamment pressurisée, la goutte ralentit et oppose à nouveau une plus forte résistance à la différence de pression, la surpression a ainsi été transmise à la bulle suivante. Si cet effet est légèrement observé lors de l'incubation d'un train de gouttes, il l'est aussi durant la génération du train et peut affecter donc l'homogénéité des gouttes formées.

Cette distribution des vitesses et des pressions dans le train de gouttes impacte la manière dont se comporte le train au moment où sa direction est changée, la réponse n'est plus limitée seulement par le temps de pressurisation des réservoirs de phase continue, mais aussi par celle du train. Les bulles qui étaient en aval du train vont être brutalement comprimées et celles qui étaient en amont vont se dilater. Les gouttes vont donc rapidement bouger aux extrémités du train, tandis que le centre du train va se réorganiser plus lentement. Nous pourrions penser que des gouttes vont s'arrêter durant le changement de direction, au risque de mouiller la paroi du tuyau, mais le changement de vitesse observé est toujours rapide et progresse sur deux fronts. Pour les trains dont la longueur n'est pas négligeable devant la longueur du tuyau, nous observons expérimentalement que le temps de réaction du train pour changer de direction est du même ordre que le temps moyen séparant le passage de deux gouttes devant le détecteur de fluorescence, soit quelques secondes, ce qui est suffisamment rapide pour nos applications. Modifier le volume des séparateurs d'air, celui des gouttes, ou leur nombre, ne change pas significativement la réactivité du train car, à fréquences de défilement égales, la pression appliquée est modifiée par l'expérimentateur pour s'adapter à la modification de résistance du train.

Nous pouvons enfin remarquer que, à cause de la compressibilité du train, il n'y a pas de correspondance exacte entre la largeur temporelle du signal de fluorescence des gouttes et leur largeur spatiale. La vitesse des gouttes fluctue en effet trop pour les différentes raisons que nous venons de présenter.

II.2.A.4 Mélange dans les réacteurs

Le déplacement des gouttes maintient la lubrification mais assure aussi le mélange continu à l'intérieur de chacun de ces bioréacteurs. Les différences de vitesse entre la goutte et la phase continue induit en effet des recirculations du milieu en interne. Ce mélange est similaire dans l'ensemble des réacteurs et assure des conditions homogènes à l'intérieur des gouttes (contrairement aux plaques multi-puits par exemple). Le mélange est d'autant plus efficace que la goutte est peu visqueuse par rapport à la phase continue, car le rapport de viscosité entre la phase continue et l'élément (les séparateurs sont aussi mélangés) fixe les lignes de courants internes, en particulier la position des anneaux de stagnation : les lignes de vorticité autour desquelles le fluide tourne (figure II-14) [46]. Les séparateurs d'air avancent plus rapidement que des gouttes d'eau, ainsi chaque goutte d'eau sera suivie par une bulle d'air qui va modifier le mélange des gouttes. Dans le cas des trains compacts, cet effet est encore plus fort.

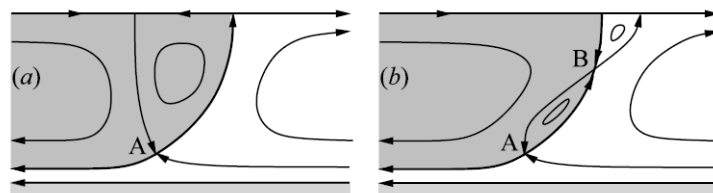


Figure II-14 : Schéma approximatif de la distribution des lignes de courants assurant la recirculation dans les éléments. (a) $\lambda \ll 1$, pour une bulle. (b) λ de l'ordre de 1 ou supérieur, avec λ petit devant $C_a^{-1/3}$. Dans notre cas, pour des gouttes d'eau, nous sommes dans une configuration intermédiaire où le point de stagnation B n'existe pas encore.

II.2.A.5 Effet de la gravité

Nous avons vu que si l'effet de la gravité sur la forme des gouttes est négligeable en microfluidique, elle commence à avoir un léger impact en millifluidique. En particulier, les séparateurs d'air vont être légèrement déformés par la gravité. La gravité peut affecter l'épaisseur du film de lubrification, modifier la distribution des pressions hydrostatiques dans le tuyau et rendre les flux inter-poches asymétriques.

Le nombre de Bond étant petit devant l'unité ($Bo=0.02$), nous pouvons négliger les effets de la variation de l'épaisseur du film de lubrification sur l'écoulement ou sur la qualité de la lubrification qui reste donc relativement homogène. En revanche, la densité de la phase continue va contribuer à modifier la pression hydrostatique : la masse volumique du FC40 est de 1855 kg/m^3 , en conséquence la pression hydrostatique varie de 1.855 mbar à chaque cm. Ceci a deux implications immédiates sur le train car l'ensemble du système fluide n'est pas à une même altitude (la différence de hauteur entre le point le plus haut et le plus bas est de l'ordre de 20cm, soit 37 mbar de variation que nous pouvons comparer avec $P_{\text{ath}} = 1 \text{ bar}$ et $\Delta P \approx 200 \text{ mbar}$) : les séparateurs d'air vont très légèrement se compresser et se décompresser, le train (moins dense) va tendre à migrer vers les points les plus élevés (à cause de la poussée d'Archimède), les réservoirs de phase continue vont modifier la différence de pression appliquée au train de gouttes car leur niveau change. De ces trois effets, seul le dernier s'est révélé avoir un impact important pour les tuyaux de rayon $0.375\mu\text{m}$. Afin de limiter son effet, nous utilisons des réservoirs dont la base présente une large surface, ainsi les variations de volume dans les réservoirs n'impliquent que de faibles variations de hauteur du fluide.

II.2.B Génération d'un train

La fabrication d'une suite de gouttes dans un canal microfluidique est un sujet bien documenté [6][18] et extrapolable à la millifluidique. Trois familles de méthodes existent pour la génération d'émulsions diphasiques : la jonction T, la focalisation de flux et l'injection coaxiale (figure II-15). Le dispositif de génération normalement utilisé en millifluidique est assimilable à une jonction T, mais d'autres géométries adaptées des autres familles existent, ainsi que des solutions propres à la millifluidique comme le « cross-flow » [60].

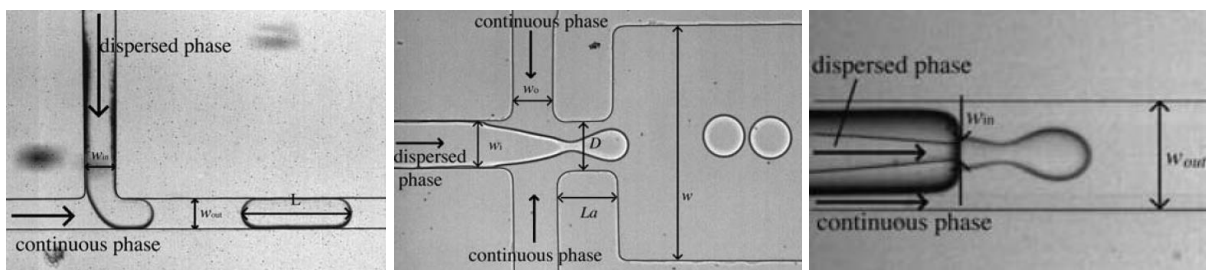


Figure II-15 : Photographies des trois familles de générations utilisées en microfluidique : jonction T, focalisation de flux et injection coaxiale[6].

II.2.B.1 Jonction T

Il s'agit d'une jonction entre trois canaux, dont un transporte la phase continue et un autre la phase à disperser, ces deux phases se rencontrent au niveau de la jonction (dont la géométrie rappelle la forme d'un « T ») où la phase à disperser est émulsionnée en gouttes. Le troisième canal transporte ainsi l'émulsion. L'émulsification dans une telle jonction est bien décrite dans la littérature [37][26].

La formation d'une goutte est conditionnée par une compétition entre la tension de surface entre les deux phases immiscibles et les forces de cisaillement de la phase continue (figure II-16). Au point de rencontre, les forces de cisaillement ne sont pas suffisantes pour décrocher une goutte de liquide ($C_a < 1$), la phase à disperser envahit ainsi la cavité de la jonction. Au fur et à mesure que cette phase progresse dans la jonction, la phase continue a de moins en moins d'espace pour circuler, sa vitesse augmente ainsi localement, tout comme les forces de cisaillement. La pression augmente ainsi en amont de la goutte de phase à disperser qui se forme. Un goulot se met en place entre la goutte et la phase à disperser, celui-ci finit par se briser sous l'effet de la pression, libérant la goutte qui pourra ainsi être entraînée par la phase continue.

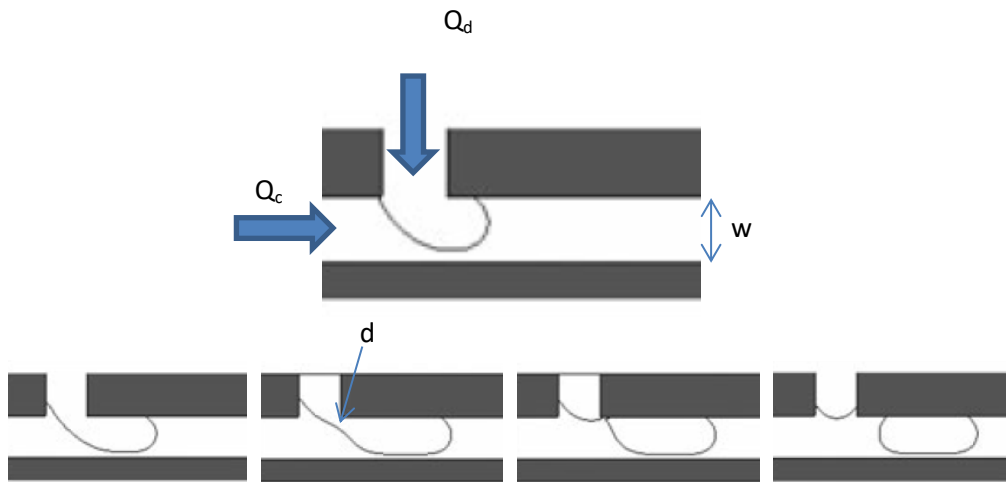


Figure II-16 : Chronophotographie [26] de la formation d'une goutte au niveau d'une jonction T.

Le volume des gouttes générées est contrôlé par de nombreux facteurs, mais il a été montré pour les jonctions T microfluidiques [37] que ce volume dépend essentiellement de la géométrie de la jonction et des débits des deux phases (équation II-6). Cette relation semble toujours être valide en millifluidique [10].

$$L \approx w + d \frac{Q_d}{Q_c}$$

Equations II-6 : Longueur L d'une goutte générée dans un canal microfluidique de largeur w à partir d'une jonction T où les débits entrants de phase continue et dispersée sont respectivement Q_c et Q_d , et où d est la largeur du goulot reliant la goutte à la phase à disperser au moment où le canal commence à être obstrué par la goutte en formation [37].

II.2.B.2 Jonction X

Le train de gouttes que nous souhaitons générer est une suite de gouttes et de séparateurs alternés. Nous devons donc générer deux émulsions calibrées alternativement. La géométrie utilisée est une jonction en croix « X », c'est-à-dire la superposition de deux jonctions T au même endroit (figure II-17). Cette jonction est donc composée d'un canal principal qui impose le flux de phase continue en amont de la jonction et transporte l'émulsion en aval, tandis que les deux autres phases immiscibles sont transportées par deux canaux situés l'un en face de l'autre de part et d'autre de la jonction. Chaque phase à disperser ressent ainsi des contraintes de la phase continue, mais aussi de l'autre phase à disperser, ce qui force le système à générer alternativement des gouttes de l'une ou l'autre phase. Ce type de jonction n'a pas encore été étudié de manière exhaustive, les études en microfluidique utilisant l'air comme phase séparatrice montrent les difficultés qu'elle représente [96], ce type de génération poly-phasique se prête néanmoins très bien à la millifluidique.

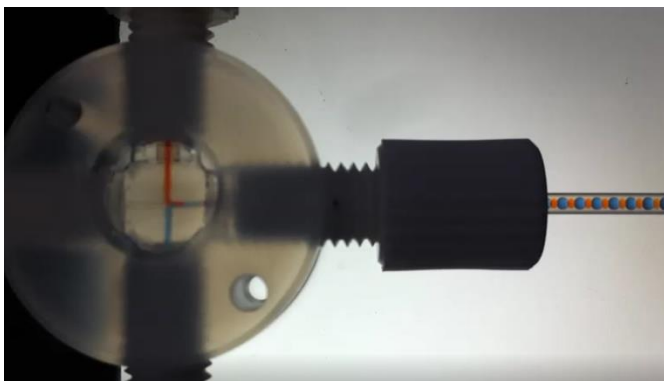


Figure II-17 : Photographie d'une jonction X utilisée dans la technologie millifluidique pour générer des trains de gouttes séparées par des gouttes d'huile. La phase continue (Huile fluorée Novec™ 7500) arrive de la gauche, la phase aqueuse colorée en rouge du haut et la phase minérale colorée en bleu du bas de l'image. L'émulsion en résultant est visible, dans un tuyau plus large que celui de la jonction X, à droite de l'image.

Dans le cas de notre technologie millifluidique, nous générons un train de gouttes homogènes séparées par des gouttes d'huile minérale à l'aide de trois pousse-seringues connectés à la jonction X. Si nous souhaitons utiliser des séparateurs d'air, la génération des gouttes est moins fiable. En effet, pour imposer un débit constant de gaz compressible au niveau de la jonction, nous la relierons à une sortie d'un contrôleur de pression via un tuyau opposant une forte résistance à l'écoulement (tuyau long et fin). La pression hydrostatique au niveau de la jonction va varier durant la formation du train de gouttes, nous devons donc nous assurer que cette variation est négligeable devant la pression imposée par le contrôleur de pression afin que la différence de pression entre la jonction et le contrôleur ne varie pas, et donc afin que le débit d'air reste stable.

En pratique, pour la génération de trains de 1000 gouttes (ce qui prend environ 20 minutes) dans des canaux de rayon $375\mu\text{m}$, nous observons toujours une variation non négligeable de la pression au niveau de la jonction entre le début et la fin de la génération, les séparateurs d'air ainsi que les gouttes générées n'ont ainsi pas la même taille au début et à la fin du train. Nous notons aussi une limitation importante de ce mode de génération de gouttes : la composition de toutes les gouttes est identique. En effet, nous souhaiterions pouvoir concevoir un train dont la composition est aussi variable et contrôlable que possible pour pouvoir cultiver nos populations de bactérie par transfert en série. La diversité acquise par un train de gouttes doit donc pouvoir être transférée au train suivant formé à partir de lui. La seule modification simple de cette technique de préparation de gouttes permettant de générer une forme de diversité de composition des gouttes est d'imposer un gradient de composition de la phase aqueuse dispersée [5], mais cette méthode ne permet pas de générer une diversité de composition très variable, c'est pourquoi un nouveau système a été créé. Ce système de génération en X sera néanmoins réutilisé et amélioré pour une autre application lors des travaux décrits dans le chapitre V.

II.2.B.3 Fragmentation de gouttes prélevées sur plaque multi-puits

Cette nouvelle approche n'utilise plus de milieu poussé par un pousse-seringue mais des échantillons de milieu ponctionnés sous forme de longues gouttes dans une plaque multi-puits, ces longues gouttes seront ensuite ré-échantillonnées en gouttes de taille normale séparées par des bulles d'air. Le principe de la technique est résumé sur la figure II-18.

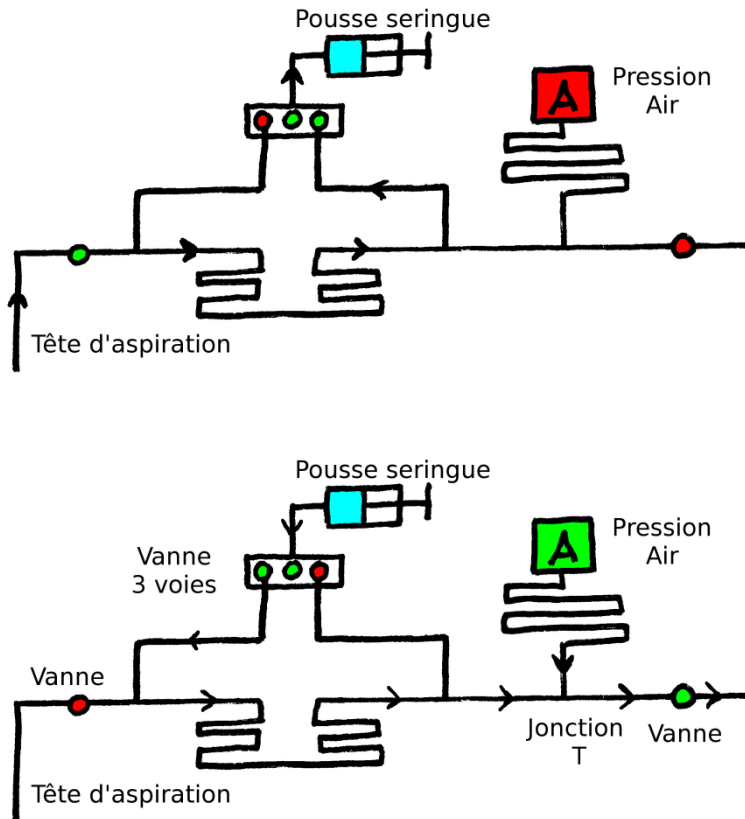


Figure II-18 : Schéma fonctionnel de la génération d'un train de gouttes par fragmentation.

Tout d'abord seul le pousse-seringue est connecté à la tête d'aspiration. Un train de longues gouttes est généré et stocké dans le tuyau.

Ensuite, la vanne de la tête d'aspiration est fermée, toutes les autres vannes sont ouvertes. Le pousse-seringue impose un mouvement constant au train qui se dirige vers la jonction T où un débit constant d'air est imposé. L'air fragmente le train lorsqu'il traverse la jonction.

Se référer à la figure III-16 pour un schéma de la tête d'aspiration.

Dans un premier temps, l'extrémité d'un tuyau connecté à un pousse-seringue, et dont la surface extérieure est lubrifiée par un apport continu d'huile fluorée, est remplie d'huile. Cette extrémité du tuyau a été allongée manuellement afin de réduire son diamètre interne. Dans un second temps, le pousse-seringue impose un débit de succion constant dans le tuyau, tandis que l'extrémité du tuyau, fixée à un bras robotisé, va successivement pénétrer dans les milieux contenus dans des puits de la plaque multi-puits. L'extrémité du tuyau étant lubrifiée, une quantité d'huile fluorée va être aspirée constamment dans le tuyau. Lorsque l'extrémité du tuyau pénètre dans un puits, il aspire du milieu sous la forme d'une longue goutte séparée du tuyau par un film d'huile fluorée. Lorsque l'extrémité du tuyau n'y pénètre plus, c'est une bulle d'air qui est aspirée dans le tuyau. On forme ainsi une succession de longues gouttes de milieu et de bulles d'air. L'étirement de l'extrémité du tuyau permet d'améliorer la précision du volume ponctionné. Dans un troisième temps, le train généré est isolé de l'extrémité du tuyau et raccordé à un autre tuyau comprenant une jonction T (via des vannes). Le pousse-seringue va alors pousser le train de longues gouttes vers la jonction T. Le train est dans le canal principal de la jonction tandis qu'un débit constant d'air est imposé dans le canal secondaire. L'apport constant d'air va insérer des bulles d'air de manière constante et va donc fragmenter chaque longue goutte en un plus grand nombre de petites gouttes. Dans un dernier temps, le train bien formé est poussé jusqu'au tuyau d'incubation et isolé du dispositif de génération. Si nécessaire, les trois premières opérations peuvent être répétées pour démultiplier les passages dans la jonction X et assurer une fragmentation plus reproductible.

Cette méthode permet de reproduire en gouttes la diversité présente sur une plaque multi-puits. Ses meilleures performances (compromis entre le nombre de milieux différents introduits et l'homogénéité de la taille des gouttes formées) ont été obtenues dans le cas de la génération d'environ 1000 gouttes à partir de 50 puits différents échantillonnés en une vingtaine de gouttes (durée de la génération : environ 30 minutes). Nous passons ainsi de $N_e=1$ à $N_e=50$.

Cette méthode de génération présente néanmoins quelques limites. La complexité du système fluide impose en effet le passage des gouttes dans de nombreuses vannes, jonctions, connectiques entre tubes qui sont tout autant de causes potentielles de mouillage et donc d'échange entre gouttes. La fragmentation des longues gouttes n'est pas très précise à ses extrémités, la taille des gouttes n'est donc pas tout à fait homogène. Nous observons qu'un gradient d'espèces peut se former lors du transport des longues gouttes et donc avant la fragmentation : les gouttes peuvent être hétérogènes en composition. Les conditions de génération sont très sensibles à la température (l'élévation de température impacte la dilatation des bulles et leur équilibre avec l'huile fluorée qui peut caviter), mais pour des raisons pratiques, elles sont toujours réalisées à la température du laboratoire. Enfin, la taille totale du train ne peut pas être facilement augmentée et le nombre de gouttes de chaque sorte ne peut pas facilement être réduit.

Ces limitations nous ont poussé à simplifier et optimiser cette méthode, car même si elle est la seule répondant à nos besoins, elle n'y est pas encore adaptée. Ce travail sera décrit par la suite dans le chapitre.

II.2.C Mesure durant l'incubation

Nous avons déjà présenté le principe de la manipulation en continu d'un train de gouttes dans le tuyau d'incubation. En appliquant une différence de pression aux extrémités du tuyau dans un sens et dans l'autre, les gouttes font des allers et retours dans le système et devant le système de mesure. Celui-ci est placé au milieu du tuyau d'incubation de manière à ce que le train puisse tenir dans chacune des moitiés du tuyau. Les extrémités de ce dernier sont chacune connectées à un réservoir d'huile fluorée où la pression est imposée. L'ordre des gouttes étant invariable, nous pouvons facilement faire correspondre une mesure effectuée avec le bioréacteur qui lui est associé. Le protocole décrit par la suite correspond au protocole que nous avons utilisé pour nos expériences et inclut donc nos modifications.

II.2.C.1 Fluorescence dans les bioréacteurs

Nous avons utilisé deux types de milieu de culture pour nos bioréacteurs. Le plus souvent il s'agit de Lisogeny Broth (LB), un milieu riche et naturellement fluorescent. Dans certains cas, en particulier quand nous souhaitons maîtriser la composition du milieu de culture, nous utilisons une solution standard de M9 (un milieu minimal) enrichie avec du sulfate de magnésium, des acides aminés (casaemino) et du glucose (20mM). Ce milieu (noté M9+G) est très peu fluorescent, juste assez pour être détecté. Le compte des gouttes se fait dans notre cas sur la détection d'un niveau de fluorescence. La fluorescence mesurée est aussi un indicateur de la biomasse de chaque goutte. Comme nous l'avons vu en effet, les souches de l'espèce *E. coli* que nous utilisons sont fluorescentes (figure II-19), leur fond génétique est celui de la souche MC4100 et un gène *yfp* a été inséré à son chromosome avec un gène de résistance à l'ampicilline, ces deux gènes sont issus d'un plasmide de Lutz et Bujard [62]. Ils sont sous contrôle d'un promoteur appartenant à l'opéron lactose, opéron absent chez MC4100, ce qui régule très peu l'expression du gène de

fluorescence qui est ainsi constitutive. Les souches utilisées ont été modifiées à partir de cette souche par Christophe Beloin [24], elles présentent une faible prédisposition à former des biofilms ou des agrégations, ce qui nous assure que les cultures soient planctoniques. La mesure de fluorescence doit donc être homogène dans les réacteurs. La protéine fluorescente YFP est dérivée de la protéine fluorescente verte GFP, dont le gène associé fut découvert chez une méduse par Shimomura [83], puis exploité pour l'analyse bactérienne par Chalfie [17] et enfin transformé en différents allèles par Tsien [93] dont YFP.

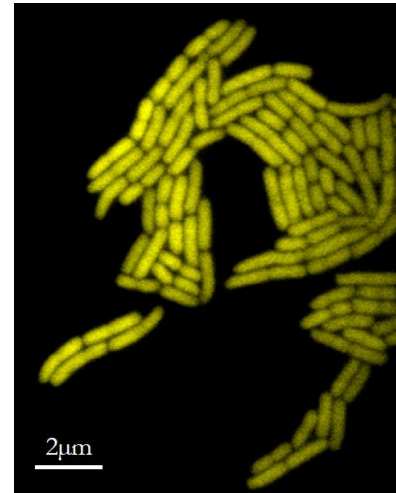


Figure II-19 : Bactéries MC4100 YFP, observée en microscopie de fluorescence (x100) [20]

L'incubation de bactéries a lieu à 37°C dans une boîte thermalisée. Dans ces conditions, les séparateurs d'air se dissolvent un peu plus rapidement, mais la pression nécessaire pour bouger le train de gouttes est plus faible comme la viscosité diminue avec la température. A cette température, le photo-blanchiment est un peu plus important. Il s'agit de la diminution de l'émission de fluorescence du milieu ou des bactéries, causée par la dégradation naturelle ou par excitation des espèces fluorescentes. Ici, la principale cause de photo-blanchiment est le faisceau d'excitation, il convient donc de limiter son intensité pour ne pas affecter le signal de fluorescence.

II.2.C.2 Mesure de fluorescence

Pour suivre la croissance des bactéries dans les bioréacteurs, nous mesurons leur signal de fluorescence. La protéine YFP présente un pic d'excitation à la longueur d'onde 515nm tandis que son pic d'émission se situe à 530nm. La source d'excitation utilisée est une diode électroluminescente (LED) dont le pic d'émission est à 505nm (Thorlab® M505L3). Nous sélectionnons l'excitation à l'aide d'un filtre transmettant de 489nm à 505nm (Thorlab® MF497-16). Le faisceau d'excitation est ensuite focalisé au centre du tuyau d'incubation à l'aide d'un objectif x20 (Leica® N plan L, grossissement 0.4, distance de travail libre 10.8mm). Une partie de la lumière émise en fluorescente pénètre dans l'objectif. Afin de séparer ce signal de mesure du signal d'excitation, nous utilisons un miroir dichroïque qui coupe à 515nm (Thorlab® MD515). Nous sélectionnons le faisceau émis par un filtre qui transmet entre 524nm et 546nm (Thorlab® MF535-22). Le faisceau d'émission ainsi nettoyé est mesuré grâce à un photomultiplicateur (PMT) (Hamamatsu H10722-01) (figure II-20). Un miroir intermédiaire laissant passer les infrarouges a été placé entre l'objectif et le miroir dichroïque pour ne pas détecter de lumière infrarouge sur le PMT. Ceci permet d'illuminer le tuyau avec une source infrarouge et de l'observer à l'aide d'une caméra infrarouge si besoin.

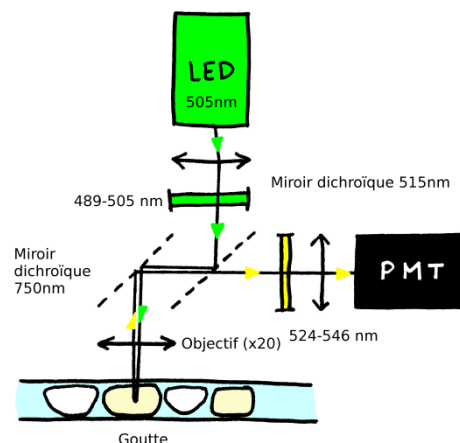


Figure II-20 : Schéma du dispositif de mesure du signal de fluorescence des gouttes.

II.2.C.3 Acquisition du signal de fluorescence

Le signal issu du PMT est enregistré en temps réel sur un ordinateur à l'aide d'une carte d'acquisition National Instrument™ interfacée avec un programme Labview. Les gouttes sont détectées et identifiées grâce à un signal minimal de fluorescence, celui du milieu. Le programme compte ainsi en direct le nombre de gouttes passant devant le détecteur en notant le nombre de fois où le signal dépasse un seuil compris entre le signal de fluorescence du milieu et l'amplitude maximale que peut prendre le bruit du signal. Ce compte des gouttes est exploité par le programme pour déterminer quand l'ensemble du train de gouttes est passé devant le détecteur et donc, quand il y a lieu de changer de sens le mouvement du train.

Le point de mesure (le point de focalisation du faisceau d'excitation issu de l'objectif) étant un peu plus petit qu'une goutte, le signal de fluorescence correspondant à une goutte présente un plateau correspondant au signal de la goutte (figure II-21). Ce signal est proportionnel à la concentration en espèces fluorescentes dans la goutte.

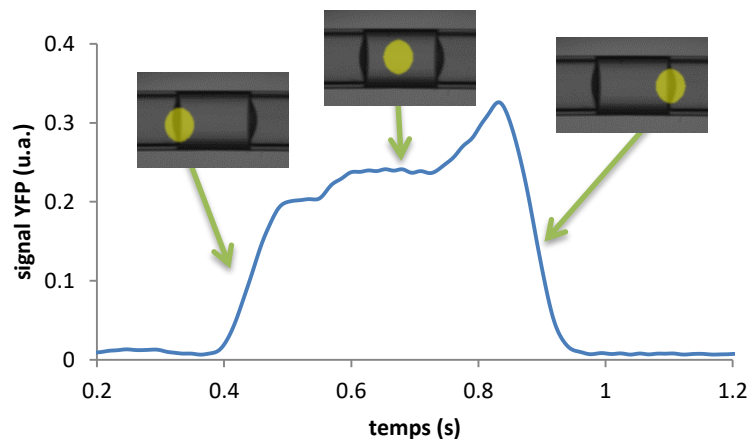


Figure II-21 : Signal renvoyé par le photomultiplicateur acquis lors du passage d'une goutte avec un échantillonnage de 210 Hz. Les images illustrent comment le passage de la goutte au travers de la « tâche » d'excitation explique la forme du signal. Quand cette tâche au centre de la goutte, le signal est uniforme. Il varie au moment où la tâche traverse l'interface entre la goutte et la bulle d'air de manière non abrupte.

Une fois l'incubation terminée, nos données se présentent comme un signal brut mesuré à chaque passage (« run ») du train de gouttes. Nous tirons du signal de chacun de ces passages, le signal de fluorescence pour chaque bioréacteur à un run donné de l'expérience. En mettant bout à bout ces différents runs, nous pouvons reconstituer l'évolution du niveau de fluorescence de chaque goutte pendant l'incubation. Comme nous ne mesurons ce niveau de fluorescence qu'une fois par passage, l'échantillonnage est donc imposé par la durée d'un run.

Ce niveau de fluorescence rend compte de la concentration en bactéries dans la goutte, et nous pouvons, pour une souche à un phénotype donné, à intensité d'excitation et à gain du PMT fixés, établir une relation fiable entre la concentration en bactéries et le niveau de fluorescence mesuré. Afin de réduire au maximum l'effet de photo-blanchiment, nous imposons une intensité d'excitation issue de la LED très faible, proche de minimum accessible. Dans ces conditions, il est difficile de reproduire à chaque

expérience exactement la même intensité d'excitation, c'est pourquoi le gain imposé au PMT est choisi pour chaque expérience de manière à toujours avoir la même correspondance entre le niveau de fluorescence mesuré (sous la forme d'une tension comprise entre 0 et 10V) et la concentration en bactéries. Nous étalonnons ainsi notre dispositif de manière à ce que le niveau de fluorescence d'une colonie de la souche *E. coli Δfln* arrivée à saturation dans du milieu M9+G diluée 10 fois soit de 1V et celui dans du milieu M9+G non dilué soit de 4V. Cette configuration nous permet de ne pas risquer que des bioréacteurs puissent saturer le PMT (saturation à 10V) tout en conservant une plage de mesure acceptable (la limite de détection est de 0.01V).

II.2.D Tri et récupération des bioréacteurs

A l'issue de l'analyse des différentes cultures incubées dans notre instrument, il peut se révéler intéressant de pouvoir en récupérer certains échantillons pour des analyses complémentaires. Un module de récupération des gouttes avait ainsi été réalisé dans ce sens, et cette possibilité est déterminante dans notre optique d'effectuer de la sélection artificielle sur ces communautés, ou du moins de maintenir un grand nombre de cultures en croissance sur des temps longs par transfert en série d'un train de gouttes vers un nouveau train. La stratégie adoptée par le laboratoire est assez astucieuse.

Souvenons-nous du dispositif robotisé permettant de générer des gouttes ponctionnées sur une plaque multi-puits : le mouvement du train pourrait y être inversé pour le pousser, goutte-à-goutte, hors du tube via ce dispositif robotisé ; ce dernier pourrait se positionner en synchronisation avec le train au-dessus de puits choisis dans une nouvelle plaque multi-puits, et où chuteraient les gouttes que nous souhaiterions récupérer. C'est ce point de vue, assez proche des systèmes de récupération de gouttes par la méthode de goutte pendante [82], qui a été mis en œuvre avec quelques petits ajouts facilitant le tri des réacteurs.

Un système de détection de gouttes a été ajouté à l'extrémité du tuyau afin de compter et identifier les gouttes (afin de s'assurer que la goutte sélectionnée est bien celle choisie) tout en s'assurant que le bras du robot bouge au bon moment pour qu'une goutte tombe dans le bon puits.

Afin de laisser le temps au robot de bouger d'un puits à un autre, les gouttes sont espacées entre-elles par l'ajout d'air séparateur au niveau de la jonction T utilisée pendant la génération : on augmente ainsi la taille des séparateurs.

Une goutte, seule, arrivée à l'extrémité du tuyau ne sera pas suffisamment massive pour tomber dans le puits. En effet, la force de pesanteur subie par la goutte est petite devant les forces de surface qui maintiennent la goutte accrochée à l'extrémité du tuyau. Nous pouvons comparer leur ordre de grandeur en première approximation (équation II-7) :

$$F_{gravité} \approx \frac{4}{3}\pi R^3 \rho g \quad (a) \quad F_{surface} \approx 2\pi r \gamma \quad (b)$$

Equations II-7 : (a) Force de gravité subie par une goutte de masse volumique ρ et de rayon R pendant à l'extrémité d'un tuyau de rayon interne r , en négligeant le poids du film d'huile fluorée attachée à la goutte. (b) Ordre de grandeur de la force de rappel sur la goutte exercée par le ménisque d'huile fluorée de tension superficielle γ , on considère que seul le ménisque à l'intérieur du tuyau contribue au rappel car le rayon de la goutte n'est pas grand devant le rayon interne du tuyau (dans ce cas le rayon de courbe du ménisque externe est grand devant r et présente une faible contribution). On estime ainsi $F_{gravité} \approx 5 \cdot 10^{-6}$ N et $F_{surface} \approx 5 \cdot 10^{-5}$ N $>$ $F_{gravité}$.

Pour permettre aux gouttes de tomber systématiquement dans un puits, un flux d'air est imposé autour de l'extrémité du tuyau de manière coaxiale. En imposant un débit suffisamment élevé, les gouttes pourront ainsi tomber dans le puits qu'elles surplombent. Cette méthode fonctionne très bien avec des gouttes de taille homogène, en revanche il peut être difficile de trouver un débit d'air adapté s'il y a de fortes variations de tailles de gouttes : pour un débit optimal, certaines gouttes seront trop petites pour tomber, tandis que d'autres, plus grandes, risquent d'être scindées en deux. Enfin, le flux d'air influence la chute de la goutte et celle-ci peut ne pas atterrir dans le puits voulu. Le temps de tri d'un train de gouttes est assez lent, généralement plus d'une heure est nécessaire pour trier un train de 1000 réacteurs.

En conclusion, nous avons ici accès à un outil complet d'analyse de culture bactérienne. Ses quelques limitations ne sont pas cruciales pour notre objectif d'évoluer des métapopulations, mais comme nous l'avons vu, il gagnerait à être optimisé pour augmenter N_e et n_b . La dernière partie de ce chapitre tentera de répondre à cette problématique.

II.3 Augmentation de la diversité manipulable en millifluidique

Nous avons vu que dans des conditions d'utilisation optimale, le dispositif millifluidique présenté juste avant est relativement limité pour manipuler une métapopulation et pour y faire émerger les formes de diversité que sont la diversité interne à chaque réacteur et la diversité des réacteurs, qui sont pourtant nécessaires pour diriger l'évolution d'un système biologique de manière durable et efficace.

Nous avons ainsi mis en œuvre deux solutions simples permettant de maintenir en culture un grand nombre de sous-populations en parallèle (augmentation de N_c) et d'augmenter le patrimoine génétique accessible de chacune de ces sous-populations (augmentation de n_b).

II.3.A Diversité inter-gouttes

L'étape limitante pour manipuler des gouttes d'origines variées dans l'analyseur millifluidique existant est la génération du train de gouttes. La diversité générée est représentative de la diversité de la plaque multi-puits à partir de laquelle le train est fabriqué. Nous pouvons multiplier le nombre de puits accessibles pour accroître sa diversité, par exemple en générant un train à partir de plusieurs plaques (à l'aide d'un nouveau bras robotisé) ou en utilisant des plaques contenant un plus grand nombre de puits. Mais le nombre de grandes gouttes qui peuvent être ponctionnées reste limité par le système de génération.

Nous avons ainsi modifié et simplifié le système de génération pour pouvoir prélever un minimum de gouttes dans chaque puits homogènes entre elles. Nous avons retiré la jonction T pour générer les gouttes dès leur prélèvement dans le puits comme décrit dans le protocole réalisé par Chabert [16]. De la même manière que nous formions des longues gouttes, nous formons ici des gouttes de la taille voulue par simple aspiration continue à l'aide d'une pousse-seringue à l'autre extrémité du tube d'incubation (figure II-22 et II-23).

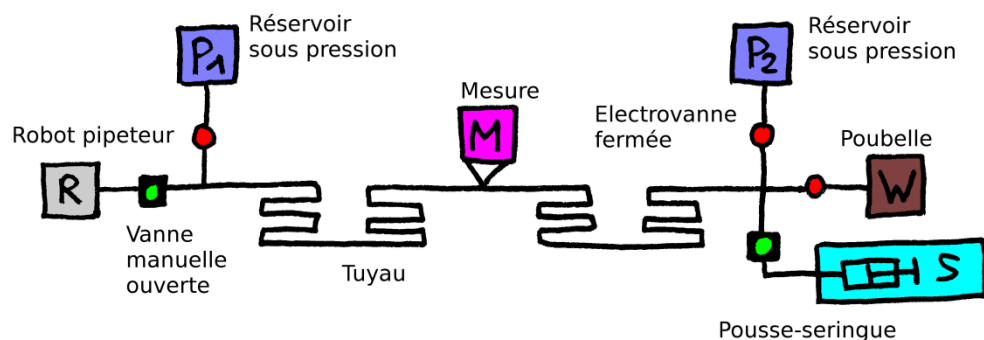


Figure II-22 : Schéma fonctionnel du nouveau système fluide complet. Pour générer un train de gouttes, deux vannes sont manuellement ouvertes pour connecter le robot pipeteur, le tuyau d'incubation et le pousse-seringue. En aspirant à un débit adapté au train que nous souhaitons former, le robot va faire pénétrer l'extrémité du tuyau dans chaque puits d'une plaque multi-puits et générer une à une chaque goutte. Une fois le train généré, nous continuons à l'aspirer dans le tuyau, puis nous fermons les vannes manuelles et lançant l'incubation (ouverture automatique des électrovannes).

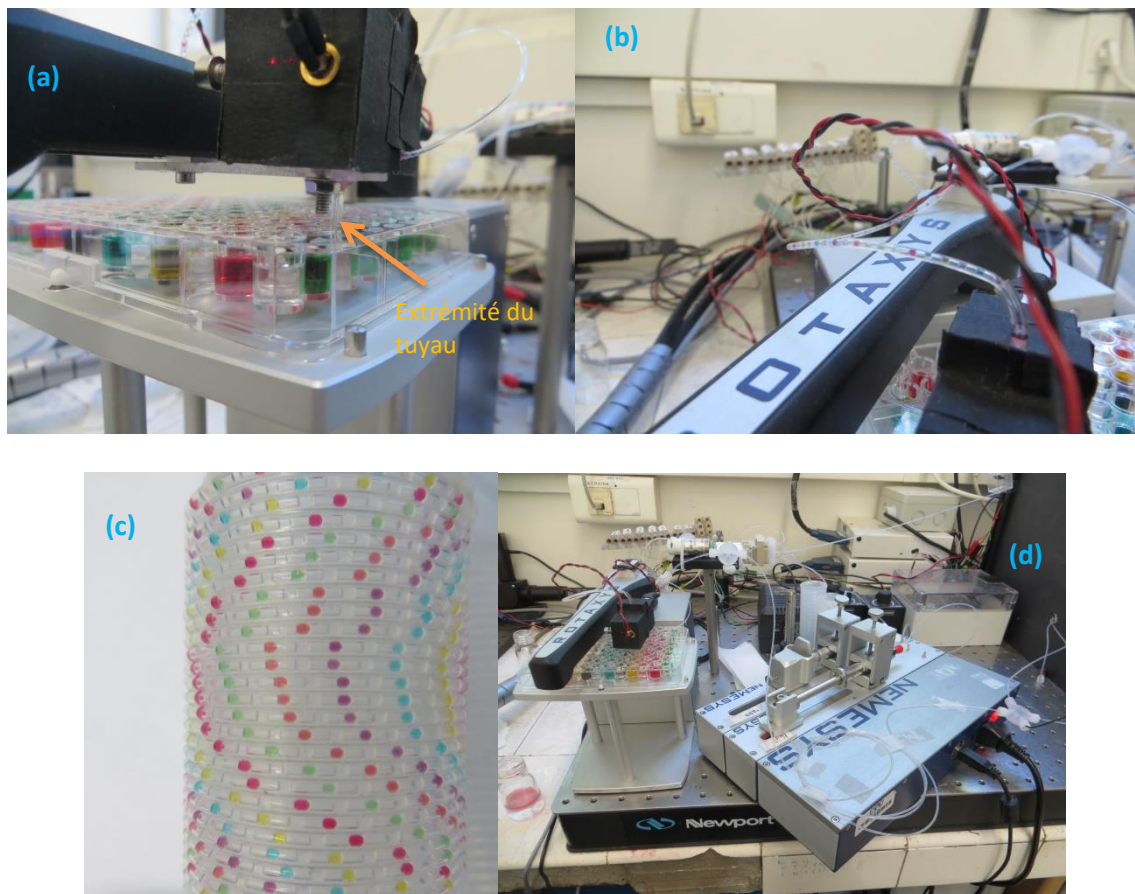


Figure II-23 : Photographies du montage permettant d'extraire une goutte de volume constant dans chaque puits. (a) La tête d'aspiration, l'extrémité du tuyau pénètre ici dans un puits. (b) Transport du train vers le tuyau d'incubation. (c) Transport du train de gouttes dans le tuyau d'incubation. (d) Montage de génération, isolé du reste de l'instrument, dédié à l'incubation et à la mesure de fluorescence.

Les effets et instabilités hydrodynamiques décrits dans II.2.A apparaissent de manière plus importante lors de la formation du train de gouttes par aspiration. En effet, la perte de charge croissante correspondant à l'augmentation de la longueur du train généré implique des variations de pression plus importantes.

En particulier, au fur et à mesure que le train se génère, un plus grand nombre de séparateurs d'air subissent une dépression de plus en plus importante. Le débit d'aspiration au niveau de l'extrémité du tuyau diminue donc de plus en plus durant la génération, les gouttes et séparateurs formés sont donc de plus en plus petits.

Un second phénomène, cette fois-ci d'origine capillaire, apparaît. Pour pouvoir aspirer une goutte de liquide, il faut préalablement déformer l'interface du liquide contenu dans le puits et initier cette aspiration. Cette opération demande aux forces de cisaillements imposées par le débit d'aspiration de vaincre la tension de surface du milieu. Cette initiation crée un retard à l'aspiration, retard qui sera d'autant plus grand que le débit d'aspiration sera faible et que le séparateur d'air sera volumineux (le séparateur va devoir se dilater et abaisser sa pression pour que la goutte puisse être aspirée).

Nous corrigeons qualitativement ces déviations en augmentant la durée d'aspiration dans chaque puits au cours de la génération. Nous prenons aussi en compte que le niveau de milieu diminue une fois qu'une goutte a déjà été prélevée. Nous obtenons ainsi des gouttes raisonnablement homogènes en une durée acceptable. La précision pourrait en effet être améliorée en diminuant le débit d'aspiration et en

augmentant le temps total de génération. Cette méthode de génération avec correction, telle que représentée sur la figure, II-22 est désormais celle utilisée par Millidrop.

Cette méthode de génération de train de gouttes produit des trains assez compacts. Le débit de lubrification de l'extrémité du tuyau influence assez peu la quantité d'huile fluorée aspirée. Nous pouvons aussi lubrifier notre tuyau en déposant un film d'huile fluorée à la surface des milieux dans les puits. L'épaisseur du film d'huile va ainsi modifier la part d'huile dans le train généré. Ce film, pour être stable (l'huile est plus dense que le milieu), est utilisé sur plaque 384 puits. C'est cette dernière option que nous avons choisie pour notre système et nous discuterons d'un de ses avantages dans le chapitre III.

II.3.B Diversité interne aux gouttes

Nous avons vu que deux effets sont à prendre en compte pour gérer la diversité interne à une goutte. D'une part, la taille des bottle necks doit être suffisamment grande pour que l'effet de la dérive génétique ne soit pas prédominant sur le devenir de la population. D'autre part, nous souhaitons qu'il soit probable qu'un mutant spécifique puisse apparaître en réponse à un stress. La solution est simple : nous devons augmenter le volume des gouttes. De la figure II-8 nous retenons que nous avons une forte marge de manœuvre pour augmenter la taille des gouttes avant de risquer de voir apparaître « trop » de mutations pour pouvoir les sélectionner indépendamment. Sachant ceci, notre travail a consisté à augmenter au maximum le diamètre des tuyaux utilisés tout en générant et manipulant des gouttes stables et indépendantes.

II.3.B.1 Diamètre du tuyau

La longueur capillaire (2.3mm) est ici la longueur caractéristique autour de laquelle le comportement de notre train va changer. En effet, la gravité est la principale force qui va venir déstabiliser notre train de gouttes. Pour déterminer le rayon maximal du tuyau avec lequel nous pourrions travailler, nous avons, pour des tuyaux de différents rayons (0.5 à 2mm), généré et incubé des trains de profil standard (les gouttes sont deux fois plus longues que le diamètre du tuyau, les séparateurs font le même volume, et l'ensemble n'est pas compact) de 1152 gouttes d'eau (3 gouttes prélevées par puits d'une plaque 384 puits) pendant 24h à 37°C et compté à l'issue de l'incubation le nombre de gouttes intactes. Sous l'effet de la gravité, les gouttes peuvent en effet plus facilement s'éloigner les unes des autres ou coalescer, par exemple. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure II-24.

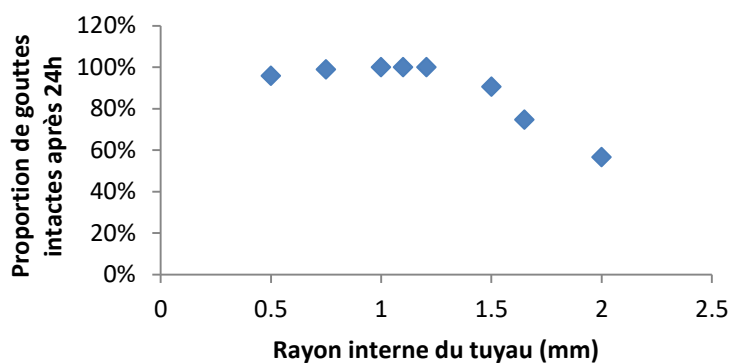


Figure II-24 : Pour des tuyaux de différents rayons, nous avons incubé des trains de 1152 gouttes pendant 24h à 37°C puis mesuré le nombre de gouttes intactes. Nous observons que les trains ne sont plus stables au dessus d'un rayon de 1.5mm, une proportion non négligeable de leurs gouttes n'est plus exploitable.

Nous observons ainsi que les trains de gouttes restent stables jusqu'à un diamètre de tuyau de 2.41mm : dès le tuyau de diamètre 3 mm nous observons des instabilités dans le train de gouttes. La manipulation du train de gouttes s'avère néanmoins délicate pour un diamètre de 2.41mm : les séparateurs d'air, plus sensibles aux effets de la poussée d'Archimède, ne sont pas tout à fait stables. Par sécurité, nous décidons donc de travailler avec un tuyau de rayon interne 1.1mm. Pour ce rayon de tuyau, nous choisissons de manipuler des gouttes de 10 μ L, ce qui correspond à des gouttes confinées exactement 50% plus longues (3.3mm) que larges (2.2mm). Les séparateurs sont dimensionnés pour faire la même taille (sauf cas particulier dans le chapitre IV). Le train de gouttes est encadré par des longues gouttes (100 μ L) et long séparateurs (200 μ L) permettant de diminuer l'étalement progressif du train dans le tuyau. Ce dernier a été dimensionné pour pouvoir manipuler jusqu'à 2500 réacteurs soit 40m (qui peut théoriquement en contenir 3000 de 10 μ L) (figure II-25).

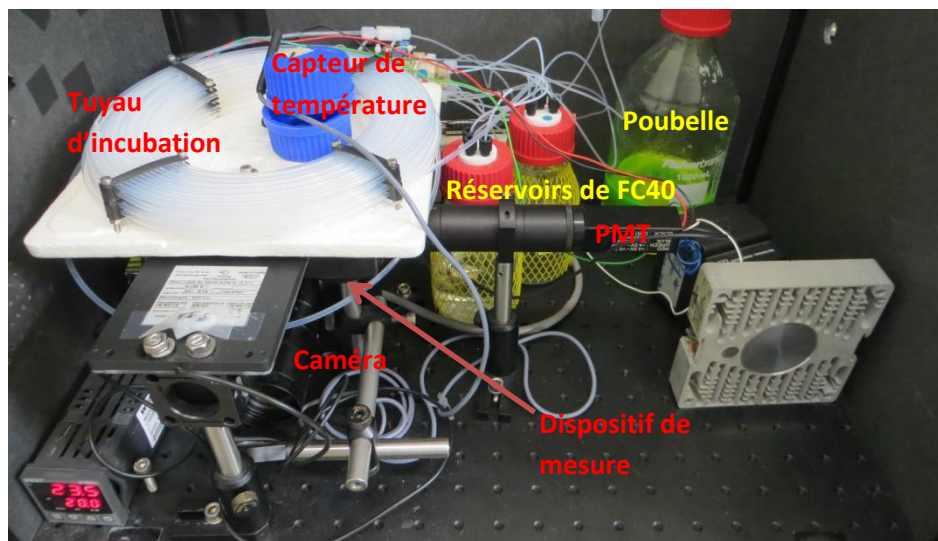


Figure II-25 : Montage pour l'incubation de nos trains de gouttes avec un tuyau de rayon 1.1mm de 40m de long. Le dispositif optique de mesure de la fluorescence est sous les tuyaux et donc non visible.

Nous calculons, sous les mêmes conditions qu'explicitées dans les équations II-2, le nombre de Reynold, le nombre capillaire, le nombre de Bond et l'épaisseur du film de lubrification correspondant à ce nouveau tuyau : $R_e = 6$, $C_a = 1.10^{-3}$, $B_o = 0.2$ et $e_l = 15\mu\text{m}$. Nous voyons ainsi que si le comportement général du fluide est inchangé, l'épaisseur du film de lubrification est significativement plus important mais est aussi plus susceptible de varier à cause de la gravité. Enfin, en triplant le rayon interne de nos tuyaux, nous avons divisé d'un facteur 100 la résistance hydrodynamique de notre tuyau, ce qui nous permet de manipuler des trains plus longs (les gouttes et les séparateurs requièrent plus de volume) et contenant plus de gouttes à des pressions aussi, sinon plus basses.

Le module de génération et de tri a lui aussi été adapté à des tuyaux de plus large volume. La génération a ainsi été calibrée pour des trains montant jusqu'à 2300 gouttes (soit 6 passages sur une plaque 384 puits). Le tri des gouttes ne requiert plus de flux d'air pour entraîner les gouttes, nous calculons en effet : $F_{\text{gravité}} \approx 5.10^{-5}$ N et $F_{\text{surface}} \approx 10^{-4}$ N. Ces deux forces sont du même ordre de grandeur, ainsi une simple déstabilisation du ménisque d'huile fluorée peut permettre de libérer la goutte, déstabilisation assurée par la pression du séparateur d'air suivant la goutte.

La manière dont nous mesurons le niveau de fluorescence est inchangée en augmentant la taille des tuyaux. La calibration est nécessairement changée et le dispositif est un peu plus sensible et moins

bruité. La manière dont nous traitons les données récoltées pour ces tuyaux, et qui est valable pour l'ensemble de ce mémoire, mérite désormais d'être décrit.

II.3.B.2 Analyse des données

La mesure et les conditions de culture en millifluidique sont comparables aux méthodes traditionnelles [20][10][5]. En particulier, il existe une bonne correspondance entre les mesures de DO et en gouttes. Nous pouvons ainsi établir une correspondance entre le niveau de fluorescence mesuré et la concentration en bactéries qui sont liées par une relation linéaire. Dans le M9+G (dont le niveau de fluorescence est négligeable et proche de 0.01V), nous avons ainsi établi qu'un signal de 4V correspond à une concentration en bactéries de $9.92 \cdot 10^8$ bactéries/mL. Nous ferons donc l'approximation dans la suite de ce travail qu'un bioréacteur arrivé en phase de saturation pour un niveau de fluorescence de 4V présente une concentration d'une bactérie par picolitre.

En analysant les courbes de croissance, il est possible de mesurer différents paramètres descriptifs de la culture, par exemple le temps de division cellulaire ou la valeur de la biomasse finale. Ce sont deux paramètres permettant de différencier simplement des populations. Nous pouvons faire une remarque sur la mesure de la biomasse finale dans le cas des populations qui s'éteignent ou sont éteintes : nous observons une sédimentation et concentration des bactéries mortes et le niveau de fluorescence mesuré devient pratiquement nul dans le cas de la souche *E. coli* Δfln utilisée.

II.3.B.3 Transfert en série

Avec la méthode ainsi décrite, il nous est possible de générer un train à partir d'une plaque 384 puits ainsi que de sortir et de trier ce train sur une autre plaque similaire. Le volume des gouttes (environ 10 μ L) n'étant pas petit devant la capacité des puits (100 μ L), il n'est pas possible de faire de dilution immédiate lors du tri sur plaque. Une étape supplémentaire de dilution est donc nécessaire entre le tri d'un train n et la génération d'un train $n+1$. Ainsi, pour transférer les sous-populations cultivées d'un train à un autre, il faut passer par plusieurs étapes critiques devant toutes être exécutées sans erreur. Le temps alors nécessaire pour effectuer ce transfert est typiquement de 3 heures, ce qui est assez long en comparaison des échelles de temps biologiques (comme le temps de division). Ce temps ne prend, de plus, pas en compte le temps de traitement et d'analyse des gouttes, travail nécessaire pour choisir quelles gouttes dans la métapopulation pourront être transférées à la génération suivante.

II.4 Conclusion

Notre dispositif expérimental millifluidique, modifié pour cultiver via des transferts en série une métapopulation de bactéries, semble adapté pour réaliser des premières expériences de sélection artificielle. Ses performances remplissent ainsi bien les conditions que nous nous étions fixées pour diriger l'évolution d'une population de micro-organismes.

Dans l'optique de sélectionner la diversité, désormais peu affectée par la dérive génétique, pouvant émerger dans une telle métapopulation cultivée en millifluidique, nous devons étudier le transfert génique entre les sous-populations, c'est-à-dire les échanges entre gouttes qui limitent la diversité inter-gouttes, ce sera l'objet du chapitre III. Nous devons ensuite réussir à faire apparaître l'émergence d'une diversité spécifique au sein des sous-populations. Cette lecture de la diversité en gouttes fera l'objet du chapitre IV.

Même si notre instrument nous semble adapté, ses performances restent réduites (notamment vis-à-vis de la fréquence de transfert qui est limitée par la durée du transfert), les échantillons biologiques sont stressés et exposés au monde extérieur (qui n'est pas exempt de micro-organismes) de plus à chaque transfert. Ces raisons ont poussé notre travail vers le développement , en parallèle de l'utilisation de cet instrument, d'une nouvelle solution technologique adaptée aux transferts en série en millifluidique digitale et qui fera l'objet du dernier chapitre de cette thèse.

Chapitre III

Echanges entre populations

III Echanges entre populations

Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux échanges potentiels entre gouttes dans notre système millifluidique. Ces contaminations sont en effet des problèmes récurrents en biologie [68][57][84], par exemple pour les cultures multi-parallélisées sur plaque multi-puits [28][29][66]. Dans le cas de la technologie millifluidique, de tels transferts ont aussi été observés par le passé et ses multiples améliorations ont souvent eu pour but de les limiter [10]. Il peut s'agir d'échanges d'individus entre populations, il s'agirait alors d'une forme de transfert génique, mais il peut aussi s'agir d'échanges de molécules entre milieux.

Ces échanges sont limitants dans le cas de l'évolution d'une métapopulation car ils imposent sa structuration. S'ils sont trop importants, ses sous-populations ne pourront plus dériver génétiquement et donc se diversifier à long terme. Ces contaminations affectent de plus notre analyse et les conditions appliquées à ces cultures. Les sélectionner artificiellement peut donc s'avérer vain si ces échanges sont trop importants. Les efforts qui ont été déployés ces dix dernières années pour développer cette technologie ont réduit l'importance de ces échanges, mais c'est seulement maintenant que nous pouvons générer des gouttes très diversifiées, que nous pouvons, d'une part, sentir leurs effets, et d'autre part, les évaluer pour connaître leur impact sur des cultures cultivées sur le long terme.

Nous présenterons tout d'abord ces phénomènes de transport et notre méthode expérimentale pour les quantifier, puis nous évaluerons ces échanges dans le cadre des opérations subies par les gouttes avant leur incubation puis pendant celle-ci.

III.1 Phénomènes de transport entre gouttes

III.1.A Objectifs

Nous avons jusque maintenant considéré que des gouttes étaient, dans notre système millifluidique, des réservoirs indépendants. Dans le cas des cultures bactériennes dans ce système millifluidique, la métapopulation composée de l'ensemble des populations cultivées dans chacun des bioréacteurs serait alors un NEM. C'est avec cette approximation que nous avons effectué notre démarche du choix et de l'amélioration d'une technologie de culture permettant d'optimiser la conservation de la diversité d'une métapopulation en limitant l'effet de la dérive génétique dans le chapitre précédent.

Si le système millifluidique est conçu pour limiter les échanges entre gouttes, il est pourtant bien connu que de tels échanges ont lieu [27][15][16][23]. Dans le cas où un train de gouttes est composé de gouttes identiques chimiquement et biologiquement, ces échanges n'affectent pas les résultats d'une courte expérience d'analyse bactérienne. En revanche, dans le cas où nous souhaitons cultiver une forte diversité de gouttes et maintenir cette diversité sur plusieurs expériences, ces échanges « naturels » peuvent être problématiques. En effet, les échanges de molécules entre réacteurs tendent à uniformiser l'environnement de chaque population, et donc les stress de sélection interne aux gouttes. Par ailleurs, les échanges d'individus entre populations peuvent réduire la diversité de la métapopulation et favoriser les individus ayant la meilleure valeur sélective non pas dans chaque goutte mais sur l'ensemble du train. Les échanges entre bioréacteurs sont donc cruciaux pour diriger l'évolution d'une métapopulation.

Nous pouvons distinguer les échanges entre gouttes voulus par le protocole expérimental (par exemple le mélange volontaire de deux populations lors de la génération d'un nouveau train de gouttes) des échanges « naturels » imputables à la technologie employée, c'est-à-dire des contaminations. L'étude de ces dernières fera l'objet de ce chapitre. Nous chercherons ainsi à évaluer à quel point elles peuvent affecter la structure de la métapopulation, si elles sont prédictibles et quels sont les facteurs qui les influencent.

III.1.B Transferts en millifluidique

Nous avons identifié les différentes étapes de manipulation d'un train de gouttes, chacune d'entre elles peut être la cause de contaminations entre gouttes. Nous avons donc décidé d'évaluer ces contaminations pour chacune de ces étapes indépendamment. Ces différents types de manipulation des gouttes sont résumés sur la figure III-1 et nous les classons en trois catégories distinctes : les étapes liées à la fabrication d'un train de gouttes, l'incubation du train, et les étapes liées à l'extraction du train de gouttes. Dans le cadre de cette thèse, notre intérêt ne s'est porté que vers les deux premières catégories. En effet, les étapes d'extraction du train de gouttes (c'est-à-dire sa sortie ordonnée hors de l'instrument et son tri) sont similaires aux étapes de génération, à l'exception du tri des gouttes, étape critique dans le bon déroulement de l'extraction et dont le développement, l'automatisation et la caractérisation sont réalisés par la start-up Millidrop.

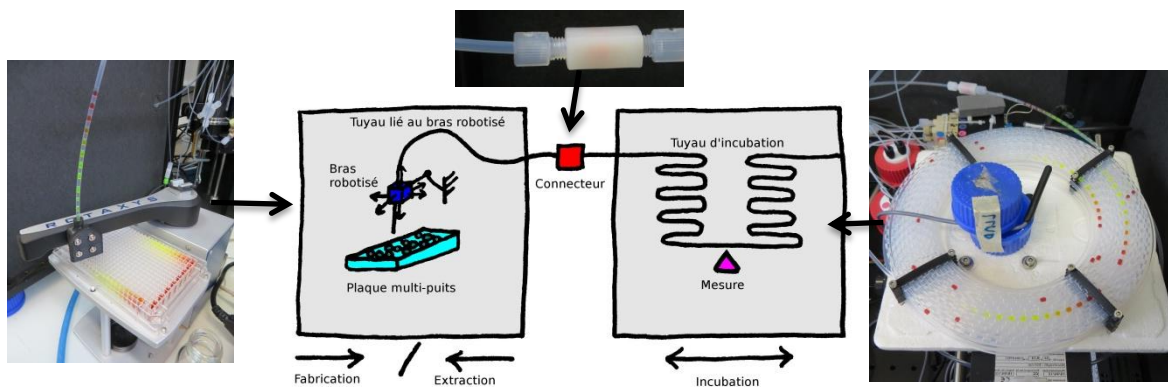


Figure III-1 : Schéma fonctionnel des trois catégories de manipulation du train de gouttes : la fabrication du train via l'extrémité du tuyau manipulé par un bras robotisé qui génère une à une les gouttes, l'incubation du train de gouttes, puis l'extraction du train hors du tuyau via le bras robotisé. L'instrument est donc séparé en deux parties, une dédiée à la génération et au tri des gouttes, et la seconde à l'incubation. Ces deux parties sont reliées par au moins une jonction, c'est-à-dire une connectique millifluidique permettant de relier sans fuite les deux tuyaux.

Nous pouvons distinguer différents phénomènes de transport de molécules ou d'individus entre gouttes, nous les avons classés en trois familles reflétant leur contribution aux échanges au sein de la métapopulation (figures III-2, III-3 et III-4) :

Transfert de phase (figure III-2) : Les molécules, particules et individus présents dans un conteneur (goutte, séparateur) sont soumises au mouvement brownien et peuvent diffuser hors de la goutte dans le fluide de la phase continue. Ces particules peuvent alors être advectées par le fluide porteur

puis diffusées dans un autre conteneur du système. Ce phénomène sera d'autant plus important qu'une particule sera susceptible de migrer hors d'un conteneur (vitesse des échanges fonction de l'affinité de la particule avec l'huile fluorée) et que sa solubilité dans la phase continue sera élevée. Ce comportement est décrit, à l'équilibre, par le coefficient de partage de l'espèce entre la phase aqueuse et la phase fluorée, c'est-à-dire le rapport de sa concentration dans la phase fluorée sur celle dans la phase aqueuse [54]. Le flux total de l'espèce entre les gouttes sera donc d'autant plus faible que le coefficient de partage le sera. A l'inverse, une espèce très soluble dans l'huile fluorée sera très rapidement transférée dans tout le système fluide. Un tel comportement est notamment attendu pour les gaz, très solubles dans l'huile fluorée [55]. Du point de vue dynamique, ces transferts seront ensuite d'autant plus rapides que le coefficient de diffusion de l'espèce dans l'huile sera grand et que le train de gouttes bougera vite.

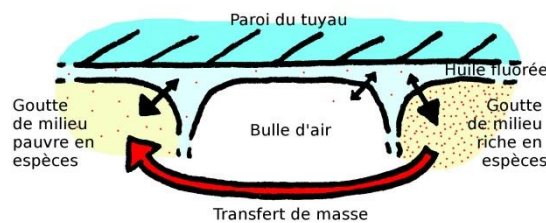


Figure III-2 : Représentation schématique des échanges entre gouttes par transfert de phase. Une espèce donnée (molécule, particule, bactérie) hydrophile est solubilisée dans des gouttes de milieu. La concentration en cette espèce n'est pas la même partout dans le système. En particulier, elle présente une concentration et une affinité différente dans la phase continue. Des espèces vont être transférées d'une phase à l'autre jusqu'à l'équilibre. La phase continue est en contact avec toutes les gouttes, elle doit donc être en équilibre avec chacune d'entre-elles. Elle va ainsi tendre à échanger des espèces avec elles jusqu'à homogénéisation des gouttes, et donc transférer les espèces des gouttes les plus concentrées vers celles les moins concentrées. Toutes les espèces ne vont pas être transférées à la même vitesse.

La surface des conteneurs peut être soumise à des contraintes pouvant la déformer et, après rupture de l'interface, induire le détachement d'un volume de fluide issu du conteneur initial. Cette émulsification peut être provoquée par des contraintes causées par du cisaillement, une adhésion, un mouillage ou encore un effet de type Marangoni. Elle peut avoir lieu dans la phase continue, créant ainsi des gouttes libres, ou encore sur un corps statique permettant ainsi des échanges avec des volumes non libres.

Transport de gouttes libres (figure III-3): cette goutte, de par sa faible taille, ne sera pas nécessairement transportée avec le conteneur dont elle est issue et peut donc franchir les séparateurs et d'autres conteneurs. Ce volume est donc dit « libre » car il n'est immobile ni dans le référentiel du train de gouttes ni dans celui du tuyau. Dans le cas où cette goutte est issue d'une rupture de la phase aqueuse, nous parlerons de goutte dite « satellite ». Une goutte libre peut fusionner avec un conteneur s'il y a rupture du film de phase continue les séparant. Des transferts discrets peuvent donc apparaître entre deux réacteurs sans favoriser d'espèces ou de particules, à condition que leur volume unitaire soit plus petit que le volume de la goutte. La formation de satellite(s) est connue lors de la génération d'une goutte, au moment de la rupture de l'interface eau-huile, tant à l'échelle millifluidique [102][91] que microfluidique [86][8][87].

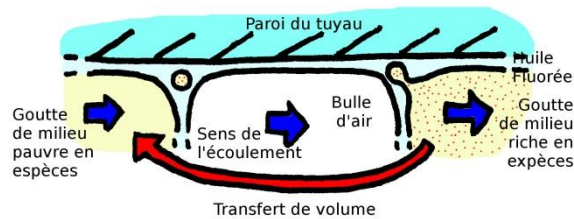


Figure III-3 : Représentation schématique des échanges entre gouttes par transport de gouttes libres. Une espèce donnée (molécule, particule, bactérie) hydrophile est solubilisée dans des gouttes de milieu. La surface arrière d'une goutte subit une contrainte de cisaillement qui la déforme. Une petite goutte peut se détacher et être librement transportée dans la phase continue. Cette gouttelette est un échantillon représentatif de la goutte dont elle issue, toutes les sortes d'espèces y sont donc transportées de la même manière. Elle pourra fusionner avec une autre goutte et ainsi y transporter avec la même probabilité toutes les espèces présentes dans la goutte dont elle est issue.

Echanges avec des volumes non libres (figure III-4): le film de lubrification isolant un conteneur peut se rompre, il y a alors contact entre le conteneur et un élément fixe du système fluidique, on parle dans ce cas de mouillage. Il peut s'agir d'un contact avec un élément solide du système (la surface du tuyau, une hétérogénéité sur sa surface), une partie de la surface du réacteur y adhèrera et celui-ci pourra y laisser un volume de liquide lorsque le réacteur s'en détachera. Ce volume de liquide piégé à la surface d'un élément peut être particulièrement exposé ou être fixé dans un volume mort de la phase continue. Dans les deux cas, le film de lubrification isolant ce volume piégé d'un conteneur ultérieur pourra se rompre, il y aura alors échanges entre eux le temps de leur contact. Ces échanges ne seront pas nécessairement identiques pour toutes les espèces, ils se feront en fonction de leur dynamique propre au moment du contact et du coefficient de diffusion de l'espèce dans la phase aqueuse. L'utilisation de tuyaux et connectiques en polymères fluorés où les gouttes sont confinées, avec peu de volumes morts, et d'une phase continue d'huile fluorée devrait limiter la formation de ces « volumes piégés » [40], mais tout défaut de surface pourrait faciliter l'initiation d'un de ces volumes [58]. Ces contaminations par mouillage ou adhérence étant systématiques, l'ajout de gouttes tampons entre bioréacteurs est généralement suffisant pour réduire significativement ces contaminations croisées [103][44].

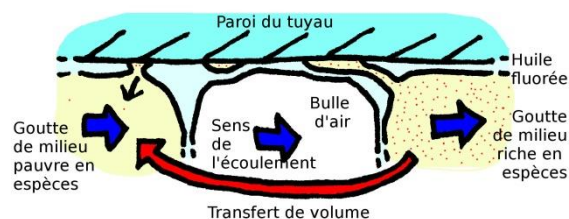


Figure III-4 : Représentation schématique des échanges entre gouttes par échanges avec des volumes non libres. Une espèce donnée (molécule, particule, bactérie) hydrophile est solubilisée dans des gouttes de milieu. Une goutte peut mouiller la paroi du tuyau et y laisser un volume de milieu piégé sur la paroi. Ce volume est un échantillon a priori représentatif de la goutte dont elle est issue. Elle pourra coalescer avec une autre goutte. Elle échangera ainsi avec elle des espèces. En se détachant, la seconde goutte pourra extirper de la paroi l'ensemble du volume piégé, mais elle peut aussi y laisser un volume, mélange des milieux des deux gouttes, qui constituera à nouveau un volume non libre qui pourra échanger des espèces avec d'autres gouttes.

La distinction entre ces trois phénomènes de transport est donc assez importante, leur origine et leur contribution en fonction de l'élément transféré sont différentes. Nous noterons que même si ces phénomènes sont par nature continus ou discrets, le résultat des échanges entre conteneurs d'éléments de faibles concentrations (comme des individus) sera probablement discret car suivant une loi de Poisson.

Le but de notre étude est de caractériser les échanges entre réacteurs, nous ne nous intéresserons donc qu'aux molécules, particules et individus dissous ou en suspension en solution aqueuse. En particulier, nous n'étudierons pas les échanges de gaz entre réacteurs et séparateurs, ou entre séparateurs.

III.1.C Méthode expérimentale

La mesure de petites contaminations consiste à évaluer de petits transferts d'espèces facilement détectables dans une goutte contaminée. Il peut s'agir d'isoler deux réactifs dont la réaction sera facilement détectable [58] ou d'utiliser un fluorophore qui soit inhibé à forte concentration. Notre instrument millifluidique est conçu pour mesurer la fluorescence de réacteurs. Nous nous proposons ainsi d'évaluer les échanges entre gouttes causés par une étape de manipulation du train de gouttes, en mesurant la variation de leur fluorescence. Nous choisissons de mesurer la quantité de matériel fluorescent entrant dans une goutte, pour cela nous allons manipuler des trains de gouttes contenant des gouttes initialement fluorescentes ou de signal nul et mesurer l'augmentation du signal de ces dernières. Si une seule goutte est initialement fluorescente, nous pouvons déterminer la quantité de matériel fluorescent sortant de cette goutte (dite goutte « source ») en sommant la quantité de matériel fluorescent reçue par toutes les gouttes voisines (dites gouttes « puits »).

Les différents phénomènes de transport entre gouttes n'ont pas les mêmes répercussions sur les différents types d'objets à transporter, nous choisissons donc de travailler avec plusieurs types de matériel fluorescent qui se distinguent notamment par leur taille mais qui présentent des longueurs d'onde d'excitation et d'émission similaires (respectivement autour de 495nm et 530 nm (495/530)) :

Solution de Fluorescéinate de sodium (FS)

Nous avons sélectionné le FS comme molécule d'étude des contaminations entre gouttes car elle est insoluble dans l'huile fluorée et très soluble dans l'eau (jusqu'à 100g/L à 37°C), ce qui nous permet de détecter de très petits échanges de matériel fluorescent (494/512). De plus, l'intensité de fluorescence du FS diminue quand sa concentration augmente (à partir de 2mM environ) à cause de l'auto-absorption du colorant [34] (figure III-5). Ceci permet à des gouttes de très fortes concentrations en FS de ne pas saturer le système optique ou d'affecter le signal des gouttes voisines dont nous voulons précisément mesurer le signal (limite de détection ~ 1 nM). Nous formerons notamment des gouttes concentrées (25mM soit 10g/L) présentant cet avantage. A plus haute concentration, une solution de FS ne permet pas de générer des gouttes par aspiration de manière reproductible et cette solution est difficile à pipeter sans risque de l'atomiser (figure III-6 à figure III-8), car la tension superficielle d'une solution de FS diminue à partir de 20g/L. Nous pouvons ainsi mesurer immédiatement des échanges de matériel fluorescent inférieurs au millionième de la quantité disponible dans la goutte source.

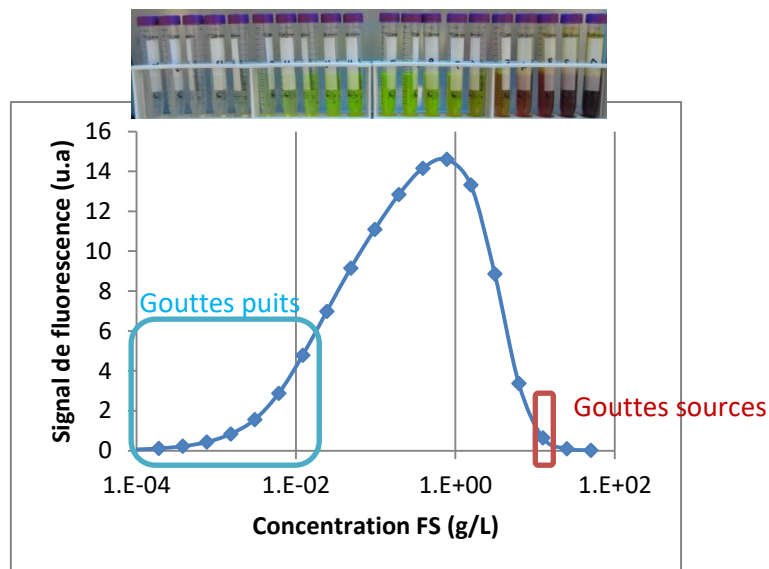


Figure III-5 : Emission de fluorescence d'une solution de Fluorescéinate de sodium en fonction de sa concentration massique et visualisation en tube à essai. Mesures effectuées au Tecan sur plaque 384 puits. La fluorescence est maximale autour de 1g/L et est proportionnelle à la concentration jusqu'à 2mg/L. Autour du maximum de fluorescence, le FS fera saturer notre PMT et biaisera notre mesure des gouttes voisines. Nous choisirons donc une concentration de 10g/L pour les gouttes « source » (en rouge) et chercherons à quantifier les concentrations inférieures à 10mg/L (en bleu).

Suspension colloïdale de nanoparticules fluorescentes de silice (PS)

Nous avons travaillé avec une suspension de nanoparticules de silice dont la surface est greffée de marqueurs fluorescents Green (485/510), une telle suspension est en effet de taille intermédiaire entre l'échelle moléculaire (FS) et l'échelle bactérienne. Nous avons ainsi utilisé des particules Sicastar-greenF plain silica de 300 nm de diamètre de chez Micromod, sa concentration maximale d'utilisation est de $1.8 \cdot 10^{15}$ particules/L (soit 50g/L). Pour ne pas affecter le signal des gouttes puits, la concentration maximale que nous pouvons utiliser dans la goutte source est de $2 \cdot 10^{13}$ particules/L alors que sa limite de mesure est $1 \cdot 10^{11}$ particules/L. Cette faible gamme de mesure ne nous permet pas de nous en servir comme un outil précis de mesure directe des échanges, mais l'ordre de grandeur de des contaminations de la PS pourra être comparé aux contaminations des autres matériels fluorescents.

Suspension de bactéries fluorescentes

Nous avons utilisé une souche *E. coli Δflu* qui est fluorescente. Il s'agit d'une souche largement utilisée en laboratoire dont le fond génétique est une souche MC4100. L'expression du gène de fluorescence *yfp* (515/530) est constitutive de nos souches (elle est très peu régulée et donc permanente et peu fluctuante). Ce gène a été inséré au chromosome de MC4100 avec un gène de résistance à l'ampicilline *ampR*, lui aussi constitutif. La souche utilisée est donc issue de cette souche MC4100 YFP *ampR* modifiée. La concentration maximale en bactéries est de $1 \cdot 10^{12}$ /L alors que la limite de mesure est de $1 \cdot 10^9$ /L. Il est donc aussi difficile de mesurer en direct les échanges d'individus entre gouttes, mais nous pouvons déterminer a posteriori ces échanges. En effet, une seule bactérie transférée dans une nouvelle goutte pourra s'y multiplier et donc être détectée sans ambiguïté après incubation. Il faut néanmoins prendre en compte que des échanges d'individus vont continuer à s'opérer entre une contamination donnée et sa détection. L'évaluation des contaminations biologiques n'est donc pas une mesure directe et elle semble donc plus adaptée aux mesures de contaminations faibles pendant l'incubation.

Recherche de contaminations

Des différentes causes possibles de contaminations dans les étapes de manipulation du train de gouttes, plusieurs ne sont pas contournables dans notre méthode actuelle et c'est sur ces causes que notre étude s'est portée. Ces étapes expérimentales sont les suivantes :

- La préparation d'une plaque multi-puits (échanges entre puits)
- La génération d'un train de gouttes (échanges entre puits successifs et entre gouttes)
- La traversée d'une jonction entre deux tuyaux (échanges entre gouttes)
- Le transport d'un train de gouttes durant la génération (échanges entre gouttes)
- Le transport d'un train de gouttes durant l'incubation (échanges entre gouttes)
- Le changement de direction d'un train de gouttes durant l'incubation (échanges entre gouttes)

Ces différentes causes ne peuvent pas être toutes analysées de la même manière et avec les mêmes marqueurs fluorescents. Ceci tient aux difficultés d'isoler une étape des autres, de mesurer la fluorescence d'une goutte avant et après un événement, et d'avoir une lecture directe des contaminations.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux contaminations apparaissant pendant les étapes de préparation du train de gouttes : remplissage de plaque, génération des gouttes, traversée d'une jonction. Ces étapes sont successives et il est toujours possible d'évaluer le niveau de fluorescence des échantillons entre ces étapes. Pour toutes ces expériences, notre approche de quantification des échanges est simple : nous préparons des solutions mères pures (pas encore de contamination) ; à partir d'elles nous remplissons une plaque multi-puits et nous mesurons au Tecan leur signal de fluorescence (évaluation des échanges causés par le remplissage de la plaque) ; à partir de cette plaque nous préparons un train de gouttes dont nous mesurons immédiatement la fluorescence en millifluidique à l'aide de notre dispositif de mesure, avant qu'elles ne traversent la jonction (évaluation des contaminations liées à la génération des gouttes) ; le train traverse la jonction entièrement, nous changeons sa direction, il traverse à nouveau la jonction et passe devant le détecteur (évaluations des échanges causés par la jonction).

Dans un second temps, nous étudierons les contaminations qui peuvent être liées au mouvement du train : transport juste après la génération, transport pendant l'incubation, impact du changement de direction. La démarche est différente ici. Nous n'avons en effet pas accès à la mesure des contaminations avant le transport de génération. Nous devons donc mesurer la moyenne de la valeur des contaminations à différentes distances de l'extrémité du tuyau. Les deux causes possibles de contaminations durant l'incubation sont indissociables, il nous faudra donc faire varier leur contribution respective pour pouvoir distinguer leurs effets.

Notre première analyse d'échanges entre réacteurs (le remplissage des plaques multi-puits) ne relève pas en soi de la millifluidique, mais elle est une étape nécessaire à toute expérience. Nous profiterons de ce cas « simple » pour présenter en détails notre protocole d'analyse, la manière dont nous comparons les contaminations chimiques et biologiques, ainsi que le paramètre descriptif des échanges que nous avons choisis d'utiliser dans toute cette étude.

III.2 Contaminations lors de la préparation

III.2A Remplissage d'une plaque multi-puits

Si des contaminations bactériennes ne sont pratiquement jamais observées lors du remplissage d'une plaque multi-puits (96 ou 384 puits, à l'aide d'une pipette électronique) dans des conditions normales pour la génération d'un train de gouttes (concentrations en bactéries inférieures à 0.1 bactérie/nL), elles sont néanmoins présentes même avec le plus grand soin apporté à la préparation de la plaque et des méthodes ont même été développées pour les limiter [79].

Ces événements sont stochastiques ; pour différentes plaques multi-puits nous avons donc compté le nombre de puits, contaminés par puits source et mesuré la fluorescence correspondante sur plaque au Tecan (figure III-6). Ces mesures ont été effectuées pour différentes concentrations de FS et de bactéries *E. coli Δflu*, les contaminations par PS n'étant pas détectables. Les résultats obtenus avec le FS (figure III-7) sont constants en dessous d'une concentration de 10g/L, au-dessus de cette valeur la solution s'atomise plus facilement et contamine donc plus de puits. Il semble que le remplissage d'une plaque peut générer des gouttes satellites (figure III-8) qui iront contaminer un autre puits dans 0.5% des cas. Ces satellites auraient un volume assez dispersé de valeur moyenne de 0.5 nL (0.1mm de diamètre).

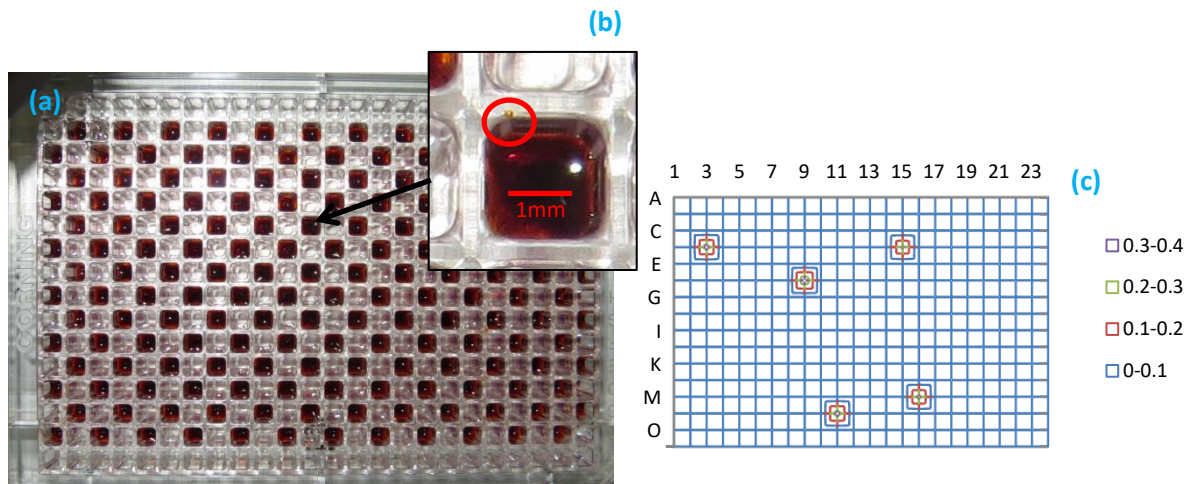


Figure III-6 : (a) Une plaque 384 puits a été remplie à l'aide d'une pipette électronique avec $v = 80\mu\text{L}$ d'eau mQ pour $n_p = 216$ puits, et $v = 80\mu\text{L}$ d'une solution de FS à $C_{FS} = 100\text{g/L}$ pour $n_s = 168$ puits. Nous ne voyons pas à l'œil nu de contamination. (b) Evaluation de la fluorescence (en u.a.) des 384 puits après passage au Tecan. Les puits devraient tous présenter un signal très faible (<0.1 u.a.), mais nous voyons que $m = 5$ puits présentent un signal beaucoup plus élevé (en moyenne 0.38 u.a., ce qui correspond à une concentration de $C_p = 0.7$ mg/L) et ont donc été contaminés.

Nous souhaitons tout d'abord évaluer combien de puits ont été contaminés par les puits sources. Il faut, en effet, prendre en considération qu'un puits source a lui aussi pu être contaminé sans que ce soit détectable, et corriger notre estimation en conséquence. Nous pouvons ainsi en déduire le nombre de puits que contamine en moyenne un puits source, N_p^s (c'est-à-dire la proportion des puits sources qui causent une contamination). **Equation III-1** :

$$N_p^s = m * \left(\frac{1}{n_p} + \frac{1}{n_s} \right)$$

Nous calculons ainsi, pour cette plaque 384 puits $N_p^s = 5.3\%$. C'est-à-dire que 5.3% des 168 puits sources ont contaminé un autre puits. Environ 9 puits ont donc probablement été contaminés mais nous n'en avons détecté que 5. En appliquant cette méthode, nous pouvons déterminer le nombre moyen de puits que contamine un puits source quelle que soit la manière dont nous remplissons la plaque. Nous pouvons ainsi regrouper les mesures de toutes les plaques remplies durant cette thèse (figure III-7).

Enfin, connaissant la concentration finale en FS des puits contaminés, nous pouvons simplement en déduire le volume de liquide qui a été transféré $V_{se} = v * C_p / C_{FS}$. Ici $V_{se} \approx 0.6\text{nL}$. Nous arrivons effectivement à distinguer des petites gouttes de diamètre de l'ordre de 0.1mm sur les bords de nos plaques (b).

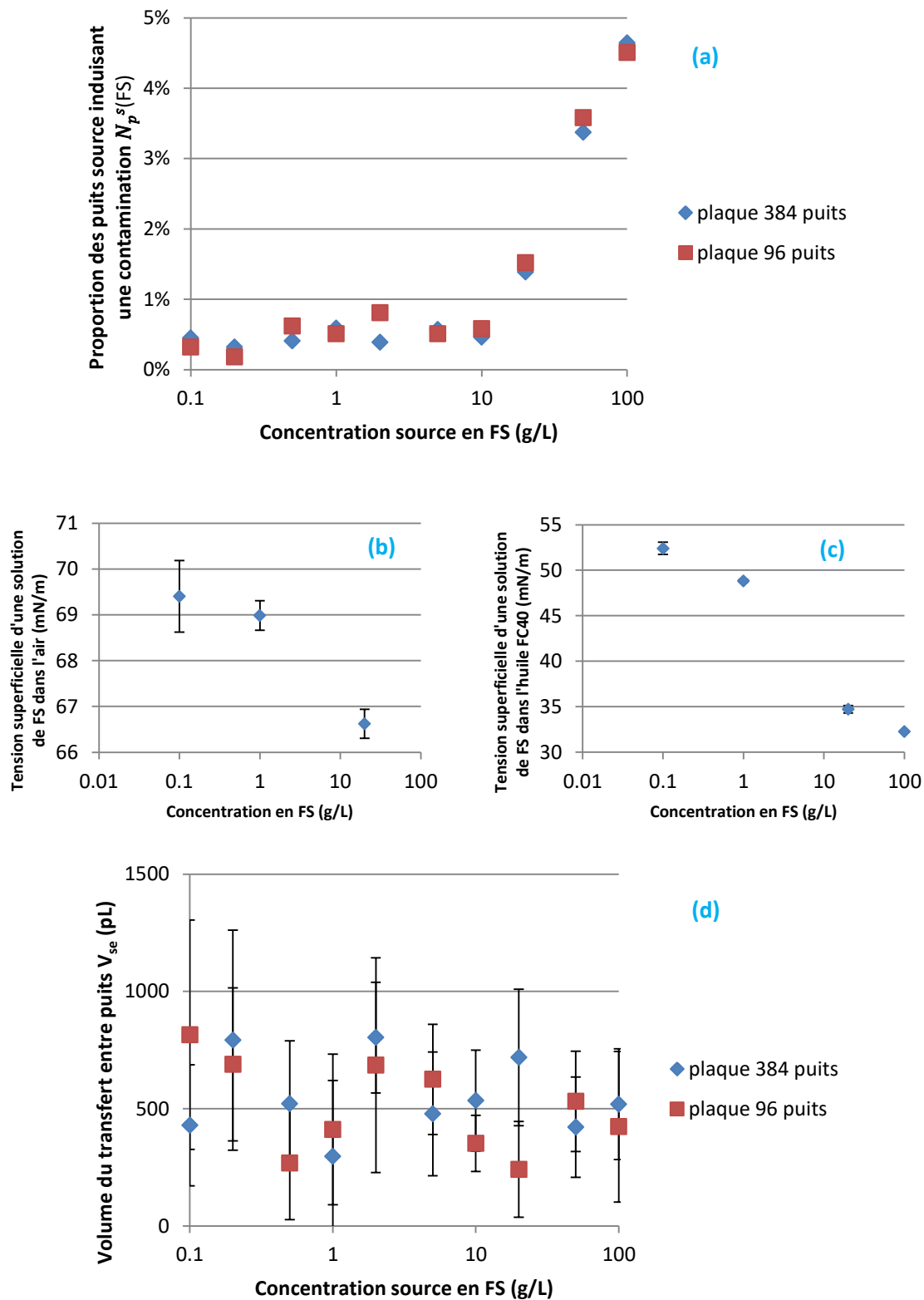


Figure III-7 : En appliquant la stratégie décrite dans la méthode de la figure III-6, nous avons systématiquement mesuré, pour les plaques remplies avec du FS au cours de cette thèse, le nombre de puits contaminés et leur signal de fluorescence pour en déduire la proportion des puits sources induisant une contamination (a) et le volume des transferts correspondants (d). Pour chaque concentration de FS, plus d'une dizaine de plaques 96 puits et 384 puits ont été préparées à l'aide d'une pipette multicanaux électronique Gilson à partir d'eau mQ et d'une solution de (au moins 200 puits source). La concentration de 10g/L est la concentration de routine choisie pour la suite en plaque 384 puits, c'est donc une petite centaine de plaques qui ont été remplies pour cette condition. Nous avons systématiquement mesuré au Tecan la fluorescence de chacun des puits. Nous observons ainsi que le nombre de contaminations engendrées par le remplissage d'un puits est stable et du même

ordre pour les deux types de plaques utilisées. En revanche leur nombre augmente avec l'augmentation de la concentration FS à partir d'une concentration de 20g/L. Nous pouvons mettre ce résultat en relation avec l'évolution de la tension superficielle d'une solution de FS mesurée dans l'air (b) et dans l'huile fluorée FC40 (c) à 20 °C ; nous observons une baisse de la tension à partir de 20g/L et il est possible que cela nous place dans un régime où plus de contaminations sont détectables. Le volume de ces contaminations reste, lui, stable et centré sur 0.5nL avec une forte incertitude (d). Par ailleurs, aucune relation entre la position des puits sources et des puits contaminés n'a été déterminée.

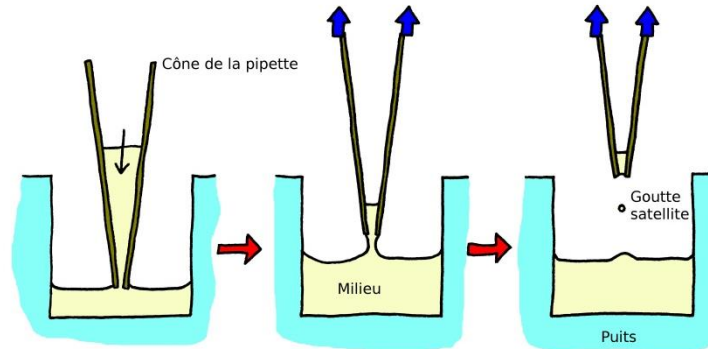


Figure III-8 : Représentation schématique du remplissage d'un puits à l'aide d'une pipette portant un cône à son extrémité. Une fois le puits rempli, et que le cône est extrait du liquide, il peut y avoir formation d'une goutte satellite. Dans la majorité des cas, cette goutte devrait retomber dans le puits, mais dans certains cas elle va retomber ailleurs, par exemple dans un autre puits.

S'il s'agit bien de contaminations par gouttes satellites, nous nous attendons à mesurer une fréquence et un volume de contaminations biologiques de même ordre de grandeur. Les bactéries, dans le cas où leur concentration est telle qu'il devrait y avoir peu de bactéries par satellite, sont soumises à une loi de Poisson : même si la concentration est très forte en bactéries, le nombre de puits contaminés sera limité par le nombre de satellites, en revanche, si leur concentration est faible, tous les satellites ne contiendront pas une bactérie et ne contamineront donc pas un puits. Nous avons ainsi représenté sur la (figure III-9) la probabilité qu'un puits source contamine un autre puits en fonction de la concentration en bactéries ainsi que la loi attendue, suivant une loi de Poisson avec les paramètres obtenus dans le cas du FS.

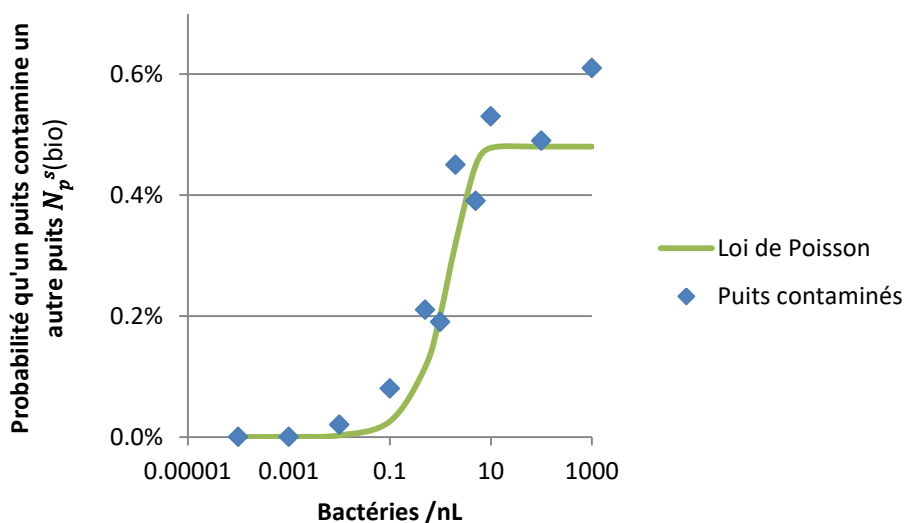


Figure III-9 : Nombre de puits contaminés biologiquement par puits source pour différentes concentrations initiales en bactéries *E. coli*. Les mesures ont été effectuées sur 10 plaques 384 puits. La détection des puits contaminés a été effectuée après 24h d'incubation à 37°C. Sous l'hypothèse que des gouttes satellites de $V_{se} = 0.5nL$ sont éjectées à chaque remplissage

de puits et contaminent un autre puits avec une probabilité $N_p^s(FS)$ de 0.5%, nous pouvons estimer N_p^s en fonction de la concentration en bactéries $C_{E. coli}$. En effet, quand la concentration en bactéries s'approche de 2 bactéries/nL, il devient probable que certaines gouttes satellites ne contiennent pas de bactéries, et qu'elles ne contaminent donc aucun puits. La probabilité qu'un puits en contamine un autre $N_p^s(bio)$ suit donc la loi de Poisson de l'Equation III-2 :

$$N_p^s(bio) = (1 - e^{-C_{E. coli} * V_{se}}) * N_p^s(FS)$$

Nous vérifions ainsi que les résultats des contaminations biologiques et chimiques correspondent bien au même ordre de grandeur de taille des gouttes satellites V_{se} et de probabilité que cette goutte contamine un puits. Il s'agit donc bien d'un transfert en volume de milieu dans ce cas précis d'échanges entre puits.

Les mesures chimiques et biologiques sont cohérentes, ce qui confirme bien des échanges entre puits par gouttes satellites lors de la préparation d'une plaque. Il est possible que ces gouttes se forment au moment où nous retirons un cône du milieu remplissant un puits. En effet, le milieu mouille la surface et l'intérieur du cône et il y a nécessairement une rupture de la continuité du liquide pour pouvoir en retirer le cône (figure III.8). L'extrémité d'un cône fait moins de 1mm de diamètre, l'extraction d'un cône engendrerait donc des gouttes satellite d'environ 0.1mm de diamètre [102] , ce qui correspond bien à l'ordre de grandeur mesuré.

Modèle du « volume satellite équivalent » V_{se}

Ce modèle des gouttes satellites étant pratique pour évaluer les contaminations, nous l'utiliserons pour décrire les échanges pour toutes les étapes de manipulations d'un train de gouttes et facilement les comparer, les échanges entre gouttes seront ainsi décrits par le « volume satellite équivalent » (V_{se}), c'est-à-dire, pour une espèce donnée, le volume théorique d'une unique goutte satellite issue d'une goutte source et fusionnant avec la goutte puits observée et dont la concentration en l'espèce donnée est celle de la goutte source (figure III-10). Nous pouvons estimer la limite de détection du V_{se} pour nos différents réacteurs et nos différentes espèces (figure III-11).

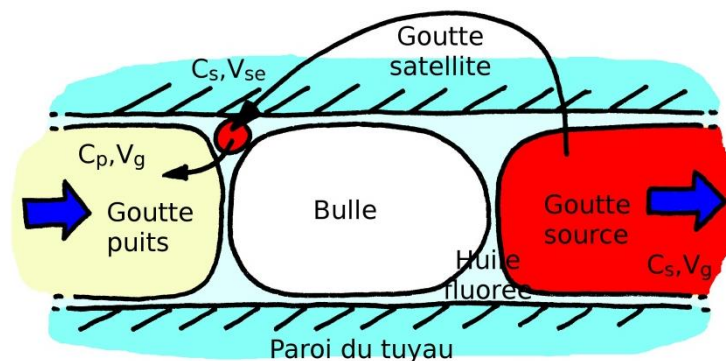


Figure III-10 : Représentation théorique du volume satellite équivalent V_{se} dans le cas d'un train de gouttes en mouvement dans un tuyau. Nous fixons le volume des gouttes V_g , la concentration en espèces (biologiques, colloïdales ou chimiques) C_s de la goutte source (et donc de la goutte satellite). Nous mesurons l'augmentation du signal de fluorescence de la goutte puits après un événement (génération de goutte, passage dans une jonction, etc.), nous en déduisons grâce à notre étalonnage (figure III-5) la concentration en espèces C_p de la goutte puits. Le volume satellite équivalent, qui nous permet d'évaluer les échanges entre conteneurs pendant un événement, nous est ainsi donné par l'Equation III-3 :

$$V_{se} = V_g \frac{C_p}{C_s}$$

V_{se} (nL)	Plaque 96 puits	Plaque 384 puits	Goutte Ø0.75mm	Goutte Ø2.2mm
FS	6.10^{-3}	3.10^{-3}	1.10^{-5}	5.10^{-5}
PS	1.10^3	5.10^2	2	10
<i>E. coli Aflu</i>	5.10^3	2.10^3	1	5

Figure III-11 : Seuil de détection des contaminations donné par le V_{se} correspondant pour le FS, le PS, et des bactéries *E. coli Aflu* non incubées, ainsi que pour les deux types de plaques utilisées, les gouttes de millifluidique classique (Ø0.75mm, gouttes de 400nL), et celles de l'instrument millifluidique que nous avons développé. A la vue de ces seuils de détection, nous n'utiliserons donc pour une mesure directe pratiquement que le FS. L'usage des bactéries pourra se faire lors de mesures a posteriori, après incubation.

Les variations de la probabilité qu'un puits contamine biologiquement un autre puits (c'est-à-dire le nombre moyen de puits contaminés par puits source) nous montre l'intérêt de travailler à faible concentration en bactéries, et du moins de chercher à manipuler avec des pipettes des populations dont la concentration est inférieure à la concentration critique de 1bactérie/nL. Au-dessus de cette concentration, chaque puits va contaminer en moyenne 0.005 puits, un transfert entre puits présente donc une probabilité de 38% d'avoir lieu dans le cas du remplissage d'une plaque 96 puits, et 84% dans celui d'une plaque 384 puits. Le volume transféré reste néanmoins plus de 10^5 fois moins important, la contribution des espèces chimiques à la modification du milieu est donc généralement négligeable. Les individus transférés présentent une forte probabilité d'être éliminés par les opérations de transfert en série à moins qu'ils ne présentent une forte valeur adaptative et qu'ils soient suffisamment présents dès le transfert afin qu'ils ne soient pas être immédiatement éliminés par la dérive génétique.

La concentration critique de 1bactérie/nL correspond approximativement à une dilution par 1000 d'un milieu saturé en bactéries. Les gouttes formées à cette concentration ne contiennent donc que quelques centaines d'individus (technologie Millidrop) à quelques dizaines de milliers pour notre instrument. Les diluer encore 100 fois, par exemple, diminue drastiquement les risques de contaminations initiaux, la probabilité qu'un transfert d'individus ait lieu pendant la préparation d'une plaque est ainsi de respectivement 0.25% et 1% pour les plaques 96 et 384 puits. Néanmoins, d'une part travailler à ces concentrations réduit fortement les populations en imposant un bottle neck de quelques individus à quelques centaines d'individus, mais l'individu transféré, même s'il est probablement seul, représente nécessairement une part non négligeable de la population. La dérive génétique se fait donc d'autant plus sentir dans de rares cas, mais des cas statistiquement probables à l'échelle d'une expérience d'évolution long terme impliquant plusieurs centaines de remplissages de plaques multi-puits. Il ne faut, en effet, pas oublier qu'une opération de dilution est nécessaire pour préparer une plaque de génération à partir d'une plaque sur laquelle ont été sorties et triées les gouttes de l'incubation précédente.

III.2.B Génération d'un train de gouttes

La mesure de la fluorescence des gouttes suivant une goutte source nous indique qu'un transfert important de matériel fluorescent a lieu au moment de la génération des gouttes, c'est-à-dire entre le remplissage de la plaque et le point de mesure après transport. Nous avons donc évalué le V_{se} pour différents indices des gouttes (figure III-12) suivant les gouttes sources (figure III-13). Nous voyons ainsi que la goutte $n=+1$ représente la majorité (98%) des transferts issus de la goutte source et que la plupart des gouttes $n>+2$ n'ont pas de fluorescence détectable, en revanche, le volume qui leur est transféré est très dispersé. Ces mesures ne sont pas compatibles avec un transfert par mouillage total (qui impliquerait que toutes les gouttes $n>+1$ présentent un signal en dessous de notre seuil de détection) et montrent que

le mécanisme de transfert est assez complexe. Pour la suite de cette étude des transferts durant la génération, nous ne nous intéresserons qu'aux transferts de proche en proche (goutte $n=+1$).

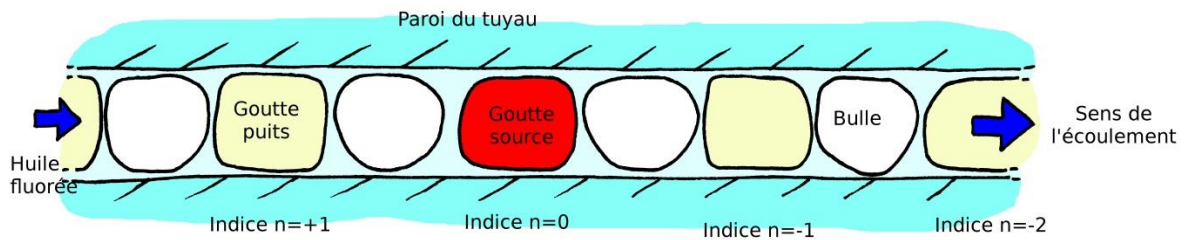


Figure III-12 : Labélisation des gouttes puits autour d'une goutte source : l'indice est positif pour les gouttes suivant la goutte source dans le sens de l'écoulement et négatif pour celle la précédent.

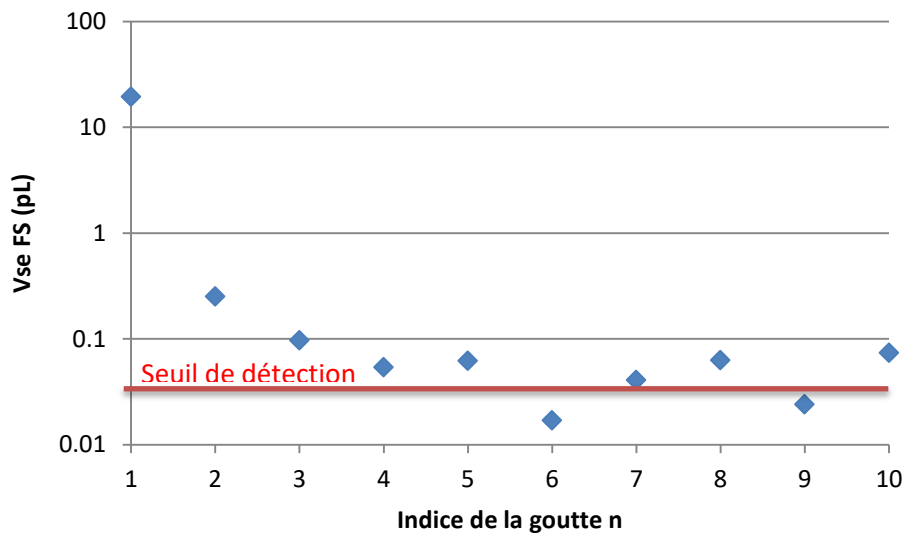


Figure III-13 : Evaluation de l'ordre de grandeur des échanges entre gouttes à la génération en fonction de leur éloignement. Génération réalisée dans des conditions standard (mesures pour 45 gouttes et séparateurs de $10\mu\text{L}$, film d'huile fluorée de 2mm sur le dessus de la solution dans le puits, aspiration à 25mL/h, profondeur de pénétration de 5mm dans le milieu). Nous voyons ainsi (et c'est aussi le cas pour toutes nos expériences dans d'autres conditions) que l'essentiel des contaminations est concentré dans la goutte suivant une goutte source. Très vite, les gouttes vont ensuite avoir un signal en dessous du seuil de détection.

Plusieurs paramètres peuvent affecter la génération et donc les transferts entre gouttes ou entre puits (figure III-14) : les diamètres internes et externes du tuyau, son matériau, la longueur de l'extrémité étirée du tuyau, sa lubrification interne et externe, le débit d'aspiration, le temps de résidence dans un puits, la taille d'une goutte, la profondeur de pénétration dans un puits. Ces paramètres ne sont pas tous indépendants, il n'est notamment pas possible de faire varier indépendamment les quatre derniers.

Ces quatre paramètres, ainsi que les diamètres internes du tuyau, affectent directement le train généré et l'homogénéité de ses réacteurs. Nous les avons donc tout d'abord fixés afin d'étudier indépendamment les autres paramètres. Nous avons ainsi travaillé avec des tuyaux de 2.2mm de diamètre interne (et 3mm externe) et généré des gouttes à partir de plaques 384 puits (une goutte par puits) à un débit d'aspiration de 25mL/h, avec un temps de résidence de 1.5s (tenant compte du niveau dans le puits) et une profondeur de pénétration de 5mm. Ces paramètres de générations permettent de former un train de gouttes de volume $10\mu\text{L}$ homogènes espacées par un volume équivalent (séparateur d'air et plug d'huile potentiel). Le processus d'étirement de l'extrémité d'un tuyau en polymère fluoré est très reproductible, et

nous obtenons donc toujours les mêmes diamètres interne (1.4mm) et externe (2.0mm) à cette extrémité pour une élévation de 100%. Nous pouvons donc étudier tout d'abord la lubrification du tuyau puis l'impact de la longueur de cette élévation sous ces conditions pour différents matériaux.

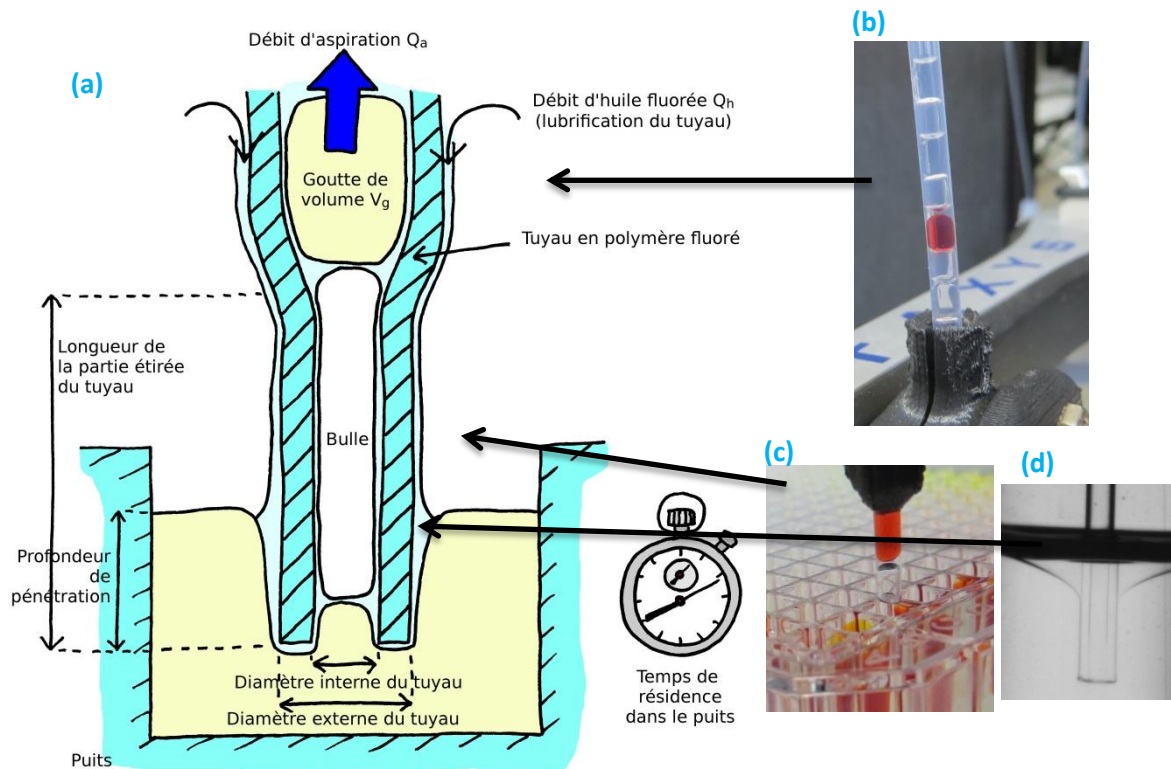


Figure III-14 : Génération d'un train de gouttes par aspiration du milieu dans une plaque multi-puits. (a) Vue de coupe schématique de l'aspiration de milieu dans un puits pour former une goutte où les différents paramètres de génération sont mis en évidence. (b) Photographie du train formé juste après la ré-augmentation de la section du tube. (c) Photographie de l'extrémité du tuyau ressortant d'un puits après en avoir extrait une goutte. (d) Photographie de l'extrémité du tuyau (diamètre fin) pénétrant à l'intérieur d'un conteneur pour former une goutte : on visualise le ménisque du film de lubrification protégeant la surface du tuyau du milieu.

III.2.B.1 Lubrification

Nous avons présenté deux procédés d'apport d'huile fluorée lors de la génération pour lubrifier le tuyau. Dans un cas, un débit continu d'huile est maintenu sur la surface externe de l'extrémité étirée du tuyau, dans un second cas, un film d'huile fluorée a été préparé sur la surface du milieu dans chaque puits de la plaque au moment de son remplissage. Nous avons mesuré la fluorescence du FS de la goutte suivant immédiatement une goutte source dans ces deux cas pour différents débits d'huile fluorée (figure III-16) et pour différentes épaisseurs du film d'huile fluorée (figure III-17) pour une longueur de l'extrémité étirée du tuyau en FEP de 50mm.

Dans le cas où nous faisons varier le débit d'huile fluorée et où il n'y a pas de film d'huile sur la surface du milieu dans le puits, nous pouvons observer ponctuellement des contaminations importantes ($>0.5nL$). En effet, nous visualisons dans ces cas la formation d'une goutte satellite de milieu au moment de la rupture de l'interface reliant la goutte en formation au milieu dans le puits et qui reste piégée dans le tuyau avant d'être emportée par la goutte suivante (figure III-15).



Figure III-15 : Photographie de l'extrémité du tuyau de génération juste après la formation d'une goutte de solution de FS à 10g/L. La surface du tuyau est lubrifiée par de l'huile

fluorée et on peut observer la présence d'une petite goutte (environ 1nL) qui reste proche de l'extrémité du tuyau sans être aspirée. Elle sera aspirée avec la goutte suivante.

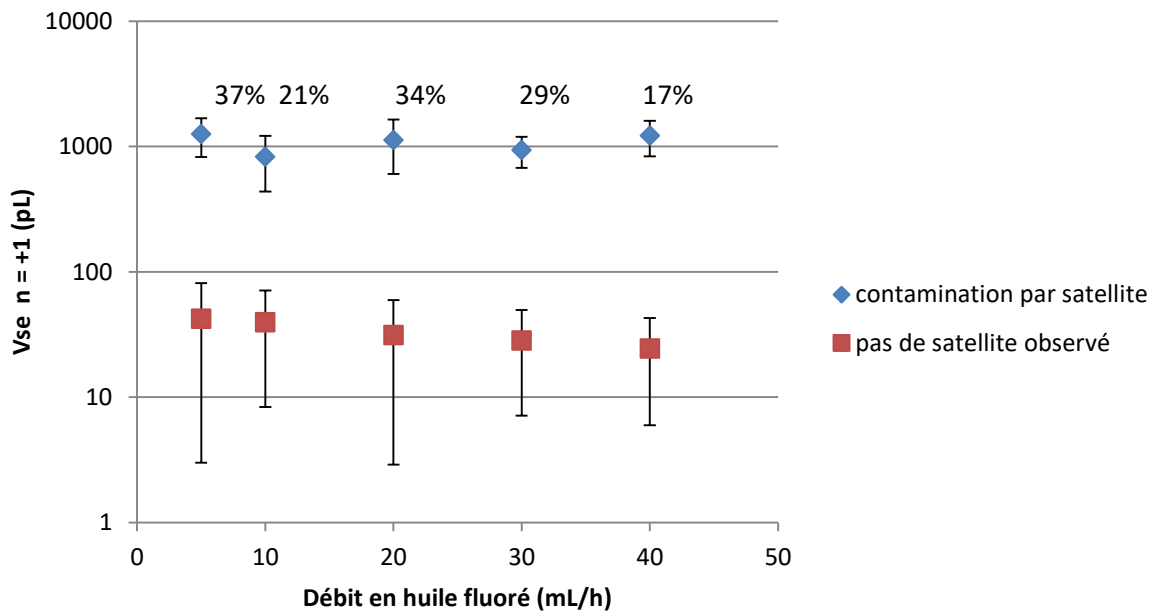


Figure III-16 : Evaluation des contaminations entre gouttes immédiatement voisines lors de la génération dans le cas d'une lubrification par débit constant d'huile. Mesures effectuées pour différents débits avec 252 répliquas. Nous pouvons séparer les contaminations de la goutte $n=+1$ à la génération en deux populations correspondant à un ordre de grandeur différent de transfert. Les fortes contaminations ($\sim 1\text{nL}$) correspondent à des contaminations par gouttes satellite, tandis qu'aucune goutte satellite n'a été observée dans le cas des faibles contaminations ($< 0.1\text{nL}$). Nous avons mesuré le volume correspondant à ces transferts pour différents débits d'apport en huile fluorée Q_h assurant la lubrification de l'extrémité du tuyau. Nous représentons ainsi le V_{se} correspondant aux satellites avec leur fréquence sur l'ensemble des gouttes contaminées, nous n'observons pas de variation significative des contaminations avec l'augmentation de Q_h , mais leur fréquence diminue. Dans les autres cas, les contaminations semblent légèrement diminuer avec l'augmentation de Q_h .

Dans le cas d'une lubrification continue du tuyau, nous observons deux ordres de grandeur de contamination. Ce satellite peut suivre la goutte formée, et fusionner avec elle plus tard ou encore retomber dans le puits dont il est issu, dans ces deux cas aucune contamination n'est observée. En revanche, ce satellite peut aussi se retrouver piégé momentanément sur la surface lubrifiée de l'extrémité du tuyau et soit contaminer le puits suivant (observé dans moins de 0.1% des cas), soit être entraîné par une des gouttes suivantes (observé dans un quart des cas, toujours pour la goutte en position $n=+1$). La formation d'un tel satellite est connue et l'ordre de grandeur de sa taille attendue est le même (1nL soit 0.1mm de diamètre) [100][102]. La taille de ces satellites ne semble pas être affectée par le débit de lubrification, en revanche leur probabilité de fusion avec la goutte $n=+1$ semble diminuer avec l'augmentation de ce débit. Dans les cas où les contaminations sont plus faibles (quelques dizaines de pL en V_{se}), nous observons une légère décroissance du V_{se} avec l'augmentation du débit de lubrification.

Dans le cas d'une lubrification par la présence d'un film d'huile fluorée uniquement sur la surface du milieu de chaque puits de la plaque multi-puits, nous ne mesurons pas de contamination causée par des gouttes satellites de 1nL. Nous mesurons une contamination systématique, indépendante de l'épaisseur

d'huile fluorée, et inférieure aux contaminations dans le cas d'une lubrification continue de l'extrémité du tuyau (figure III-17).

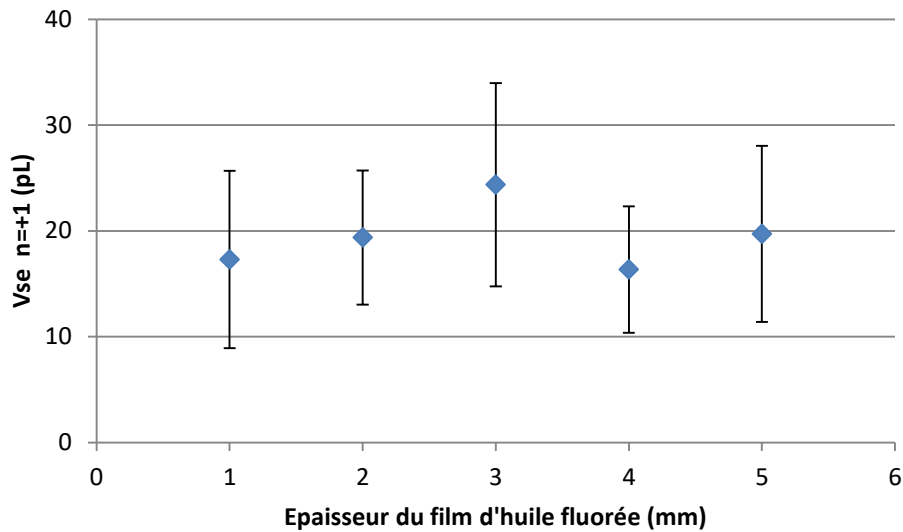


Figure III-17 : Evaluation des contaminations entre gouttes immédiatement voisines lors de la génération dans le cas d'une lubrification par présence d'un film d'huile fluorée sur la surface du milieu prélevé. Pour chaque épaisseur de film, nous avons mesuré 158 répliquas. Ces contaminations sont indépendantes de l'épaisseur du film et sont du même ordre de grandeur que les contaminations dans le cas d'un débit maximal. Ces échanges sont très variables mais systématiques.

La taille de ces contaminations ne permet pas une mesure directe des transferts de PS ou de *E. coli* Δflu , néanmoins nous avons pu évaluer l'ordre de grandeur des transferts de *E. coli* Δflu en mesurant la croissance bactérienne des gouttes puits pendant l'incubation. Pour ces expériences, aucune jonction n'a été utilisée entre les tuyaux de génération et d'incubation (il s'agit d'un unique tuyau qui a été coupé après la génération) et les paramètres de lubrification ont été fixés à un débit de 20mL/h ou une épaisseur de film de 2mm. En mesurant le retard à la croissance des gouttes contaminées, nous pouvons distinguer les gouttes contaminées pendant la génération des gouttes contaminées pendant l'incubation. Pour les transferts durant la génération, nous pouvons évaluer le Vse grâce à la mesure de ce temps de retard à la croissance car nous connaissons le moment du transfert en question (ce qui n'est pas le cas pour les contaminations dues à l'incubation). Ce temps de retard nous informe en effet sur la taille de l'inoculum du transfert et donc sur le volume transféré. Pour avoir une relation fiable entre l'inoculum et le volume transféré, il nous faut nous placer à concentration en bactéries proche de la saturation (ici 500bactéries/nL), ce qui conditionne une croissance rapide des gouttes sources et donc une mesure peu précise du temps de retard. Nous avons donc évalué le Vse en faisant varier la concentration en bactéries et en comparant la proportion de gouttes contaminées à la distribution de Poisson attendue avec les paramètres obtenus dans le cas du FS (figure III-18).

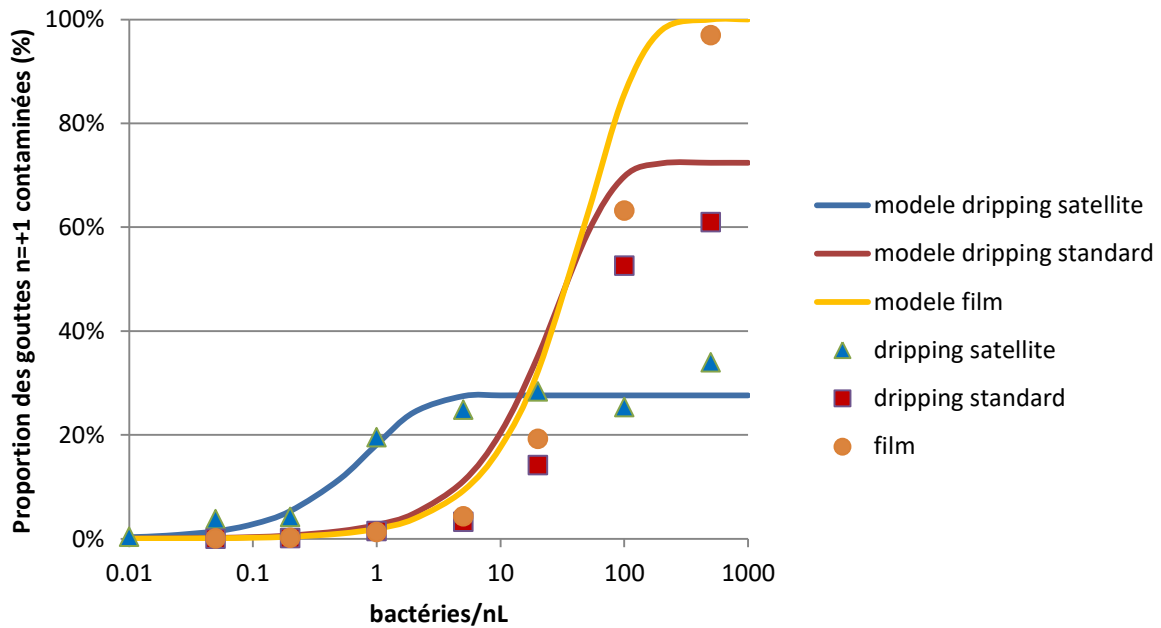


Figure III-18 : Parmi les gouttes contaminées biologiquement lors de la génération, nous distinguons les différents cas de contaminations (satellite ou non) et évaluons le pourcentage de gouttes n=+1 contaminées dans chaque cas par rapport à l'ensemble des gouttes n=+1. Avec le V_{se} déterminé plus tôt et leurs proportions respectives, nous modélisons leur proportion attendue. Globalement les résultats concordent, mais on observe une diminution de 50% du V_{se} biologique dans les cas sans satellite. Les contaminations à la génération ne semblent donc pas transférer de manière identique le FS et les bactéries.

Si les résultats concordent pour les transferts de FS et de bactéries via les gouttes satellites observées ($V_{se}=1nL$), ce n'est pas le cas pour les transferts plus faibles ($10pL < V_{se} < 100pL$) où le V_{se} mesuré pour les bactéries est plus faible que celui pour le FS (figure III-19). Le processus responsable des échanges entre gouttes n'agit donc pas de la même manière pour des molécules et des corps plus volumineux. Une hypothèse raisonnable serait de supposer qu'il apparaît un phénomène de mouillage au moment de la génération en plus de la formation de gouttes satellite. Nous avons par la suite choisi de travailler avec la méthode de lubrification impliquant un film de 2mm d'huile fluorée et d'appréhender les transferts à la génération avec le FS.

Génération	Dripping Satellite (nL)	Dripping standard (pL)	Film (pL)
V_{se} (FS)	1.1 ± 0.4	31 ± 27	19 ± 8
V_{se} (<i>E. coli</i> Δflu)	1.0 ± 0.5	15 ± 8	10 ± 5

Figure III-19 : Résumé des V_{se} obtenus dans les différents cas de lubrification de génération.

III.2.B.2 Nature du matériau du tuyau

Nous avons évalué le Vse transféré dans la goutte $n=+1$ pour différents diamètres externes de l'extrémité du tuyau ainsi que pour différents polymères fluorés à notre disposition, sans étirer l'extrémité du tuyau (figure III-20). Si nous observons un Vse différent pour les quatre matériaux, ce volume n'augmente pas significativement avec l'augmentation de l'épaisseur de la paroi du tuyau en comparaison de nos marges d'erreur.

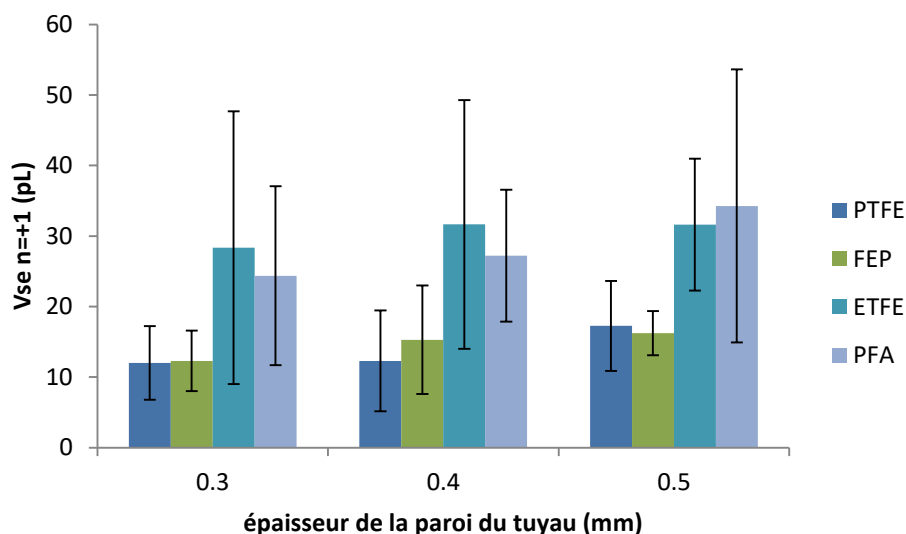


Figure III-20 : Evaluation des contaminations de générations pour différents matériaux composant le tuyau et différentes épaisseurs. Chaque condition a été évaluée sur 158 répliquas. Les contaminations sont toutes du même ordre de grandeur, avec de meilleures performances pour le PTFE et le FEP. L'épaisseur de la paroi du tuyau n'augmente pas significativement les contaminations.

III.2.B.3 Étirement de l'extrémité du tuyau

Nous avons ensuite évalué le Vse transféré dans la goutte $n=+1$ pour différentes longueurs de l'étirement de l'extrémité du tuyau ainsi que pour différents polymères fluorés à notre disposition, pour une épaisseur de paroi non étirée de 0.4mm comme précédemment (figure III-21). Le Vse semble ainsi être une fonction affine de la longueur de l'extrémité étirée du tuyau. Une forme de transfert entre gouttes a donc lieu le long de cette partie du tuyau, il s'agit probablement d'un phénomène de mouillage sur la surface du tuyau. Nous pouvons supposer que l'étirement du tuyau affecte la qualité de la surface interne du tuyau. Le PTFE, le matériau le plus fragile utilisé, est particulièrement affecté par cet étirement puisqu'il induit des contaminations équivalentes au FEP quand le tuyau n'est pas étiré, tandis qu'après étirement, il contamine deux fois plus, soit autant que l'ETFE et le PFA. La surface du PTFE est en effet beaucoup plus affectée par cet étirement, le polymère se microfissure et devient plus opaque. L'endommagement de la surface interne du tuyau par son étirement peut se comprendre par une approche géométrique : les surfaces ne sont pas conservées lors de l'élongation d'un tuyau.

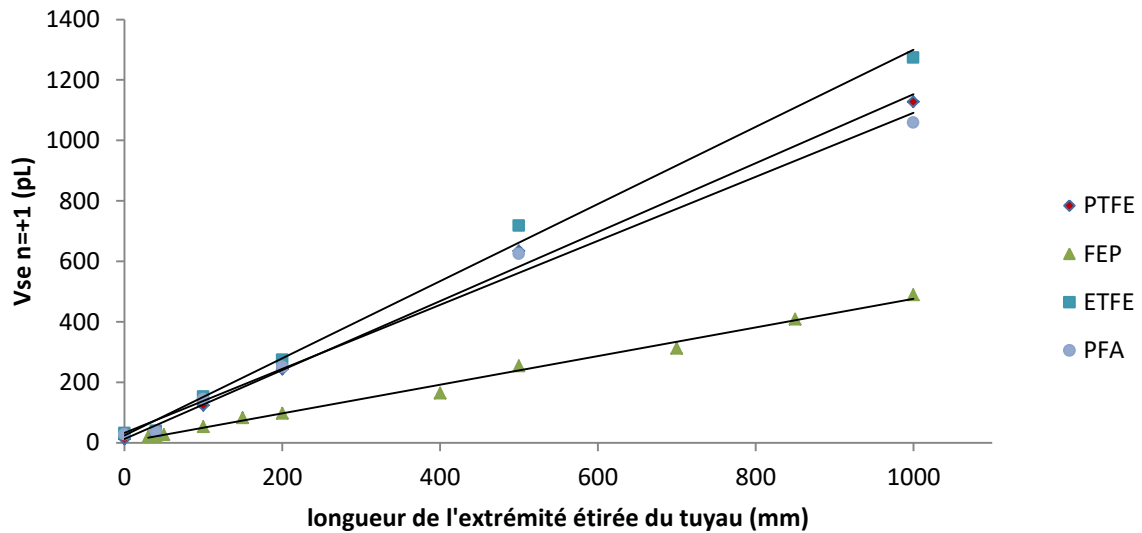


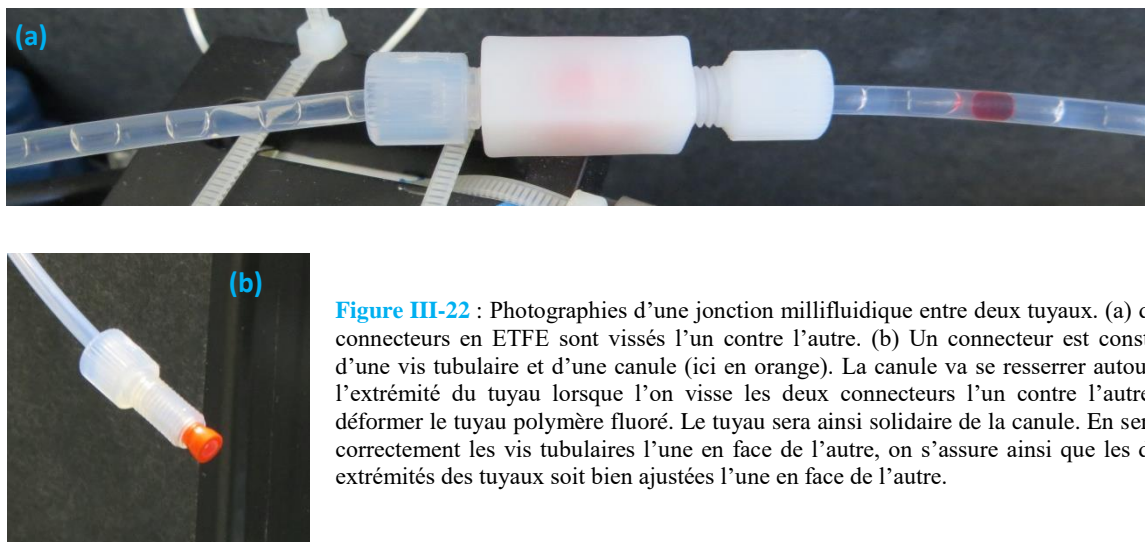
Figure III-21 : Evaluation des contaminations de générations pour différents matériaux composant le tuyau et différentes longueurs d'étirement de son extrémités. Chaque condition a été évaluée sur 158 répliquas. Le volume échangé entre gouttes est proportionnel à cette longueur et dépend du matériau. Si le FEP est toujours moins source de contamination que le PFA et l'ETFE, ce n'est plus le cas du PTFE.

Nous avons finalement étudié l'impact du débit d'aspiration, du volume des gouttes, du temps de résidence dans un puits et de la profondeur de pénétration dans le milieu d'un puits sur les transferts entre gouttes, mais nous n'avons observé aucun impact majeur (Annexe 2).

En conclusion, cette étude phénoménologique des transferts entre gouttes nous a permis d'évaluer l'importance des transferts entre gouttes durant la génération, de préciser l'importance du tuyau (son matériau et son étirement), de sa lubrification et du débit d'aspiration du train. Nous avons pu, à l'aide de ses résultats, choisir un protocole de génération de train, et il nous sera possible de prédire un ordre de grandeur des transferts génériques entre populations imputables à cette étape dans une expérience d'évolution sur le long-terme.

III.2.C Traversée d'une jonction entre deux tuyaux

Pour réaliser, dans la partie précédente, les mesures de contaminations bactériennes imputables à la génération des gouttes, nous avons dû utiliser un unique tuyau pour la génération et l'incubation et le couper entre ces deux étapes. En pratique, nous utilisons deux tuyaux bien distincts reliés entre eux par différentes pièces comme des vannes/croix/jonctions. Chacune de ces pièces est une source potentielle de contaminations car elles sont des discontinuités dans le parcours du train de gouttes (elles sont connectées à chacune de leurs extrémités à un tuyau par une jonction) et peuvent présenter des propriétés de surface moins bonnes que le tuyau (matériau différent, surface altérée). La source minimale de contamination est donc la jonction entre deux objets (tuyau-pièce ou tuyau-tuyau). C'est pourquoi nous avons évalué la contribution de la jonction la plus simple (la connexion entre le tuyau de génération et celui d'incubation (figure III-22)) aux transferts entre gouttes.



III.2.C.1 Nature du matériau du tuyau

Afin d'évaluer les transferts entre gouttes lors du passage au travers d'une connectique, nous avons mesuré la fluorescence du train de gouttes juste avant son passage par la jonction, puis nous avons inversé la direction du train afin qu'il passe une seconde fois par la jonction et au point de mesure. Nous pouvons alors déduire le V_{se} causé par la jonction en soustrayant le signal initial (contamination de génération) du signal final. Nous avons tout d'abord évalué pour différentes jonctions entre tuyaux en FEP 2.2mm les transferts entre gouttes $n=+1$ de $20\mu\text{L}$ pour un débit de 25mL/h (figure III-23). Nous constatons ainsi que les transferts sont très dépendants de la jonction et donc peu reproductibles pour un même protocole, il faudrait donc potentiellement réévaluer ces transferts à chaque nouvelle expérience. Nous n'avons évalué par la suite que des ordres de grandeur des échanges chez les quatre matériaux fluorés les plus utilisés (figure III-24).

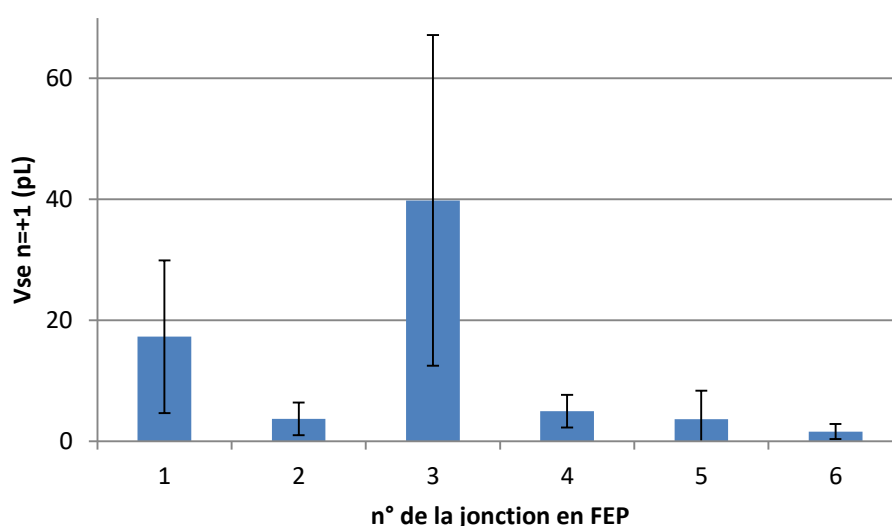


Figure III-23 : Evaluation des contaminations causées par le passage du train au travers d'une jonction en FEP pour différentes jonctions censées être identiques. Le V_{se} est toujours de l'ordre de 10pL pour ces différentes expériences, mais les mesures sont d'une part variables entre elles et variables pour une même jonction. Il est donc difficile de quantifier précisément les contaminations d'une jonction, nous pouvons juste en déterminer un ordre de grandeur.

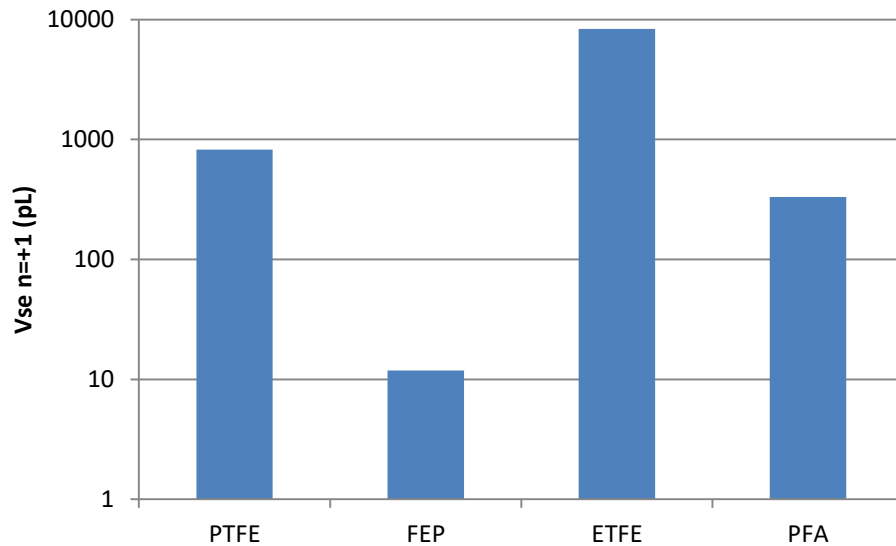


Figure III-24 : Evaluation des contaminations causées par le passage du train au travers d'une jonction pour différents matériaux composant les deux tuyaux. Le FEP présente de meilleures performances.

III.2.C.2 Impact du train

Nous avons par la suite étudié l'impact du volume des gouttes et du débit sur les transferts pour une même jonction entre deux tuyaux en FEP (figure III-25). Il apparaît que la vitesse du train n'affecte pas significativement l'importance des contaminations. En revanche, l'importance des transferts dépend du volume des gouttes, si les transferts sont constants pour les volumes inférieurs à un volume critique (de l'ordre de 25 μ L, c'est-à-dire des gouttes trois fois plus longues que le diamètre du tuyau) et augmentent ensuite significativement avec la taille des gouttes. Ces résultats nous incitent à travailler avec des gouttes de volume inférieur à cette valeur critique.

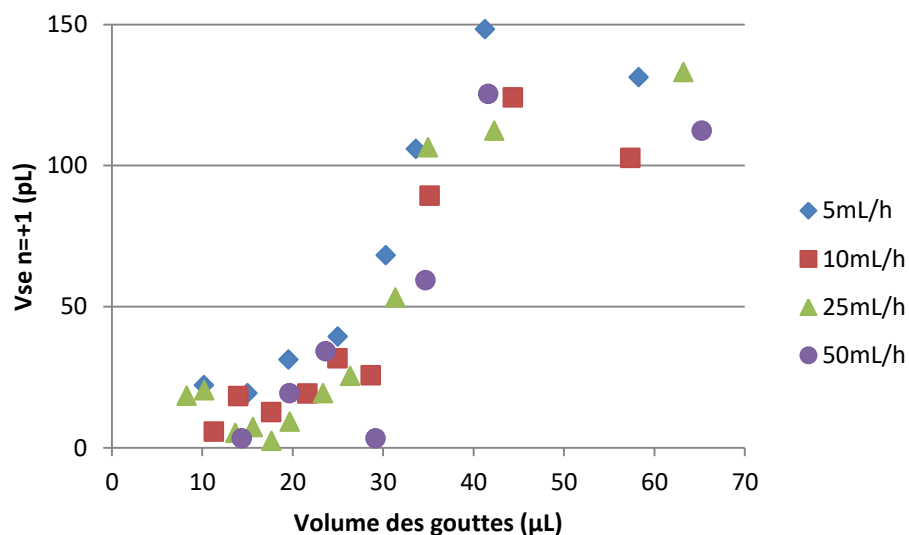


Figure III-25 : Evaluation des contaminations causées par le passage du train au travers d'une unique jonction en FEP pour différents débits de passage et différentes tailles de gouttes (10 répliquas par point). Nous observons que le débit n'impacte pas les contaminations, mais une transition est observée sur le volume des gouttes entre 30 et 40 μ L (ce qui correspond à des gouttes 4 fois plus longues que la diamètre du tuyau).

La contribution moyenne d'une jonction aux transferts semble plus importante que celle de la génération pour tous les matériaux à l'exception du FEP (même ordre de grandeur), néanmoins les transferts y ont une portée beaucoup plus importante. Le processus de contamination attendu pour une jonction est un mouillage de la discontinuité du tuyau ou du liquide piégé dans l'interstice entre les deux tuyaux qui constitue un volume mort. Mais il semble que le passage des gouttes par une jonction forme des satellites de petites tailles qui, eux, seraient capables de contaminer d'autres gouttes sur une plus grande distance.

Pour résumer brièvement les résultats les plus importants de cette partie, nous dirons que les contaminations de préparation sont rares, stochastiques et de taille importante ($V_{se} \approx 1\text{nL}$) pour le remplissage des plaques multi-puits, ils sont causés par des gouttes satellites. En revanche ils sont consistants, variables et plus faibles ($V_{se} \approx 10\text{pL}$) pour la génération des trains et leur passage au travers d'une jonction dans le cas d'un tuyau en FEP et d'une lubrification par dépôt d'un film d'huile dans les plaques multi-puits. La majorité des transferts ont lieu entre deux gouttes se suivant.

III.3 Contaminations durant le mouvement du train

Les transferts entre gouttes durant le mouvement du train (en particulier durant l'incubation) sont probablement différents à bien des égards des contaminations déjà étudiées : il s'agit d'une part des échanges pouvant apparaître durant le transport simple du train de gouttes (pendant la génération par exemple) et d'autre part des échanges entre gouttes causés par les va-et-vient à 37°C d'un train dans un tuyau a priori sans discontinuité. Le mouvement d'un train de gouttes pendant l'incubation est simple, le train avance à vitesse donnée sur une distance donnée puis change de direction et répète cette séquence jusqu'à arrêt de l'incubation. Pour évaluer les échanges entre gouttes, nous allons appliquer un protocole similaire aux protocoles précédents : nous générons un train de gouttes avec quelques gouttes isolées très concentrées en matériel fluorescent, nous mesurons la fluorescence de chaque goutte au début de l'incubation puis à certains moments de l'incubation, nous en déduisons l'augmentation de la fluorescence et donc des échanges ayant lieu durant l'incubation.

La vitesse de déplacement du train est fixée par nos conditions expérimentales. Nous imposons une pression à une extrémité du tuyau qui soit suffisamment élevée pour ne pas observer de mouillage et suffisamment faible pour ne pas observer de scission des gouttes. Typiquement, pour notre système expérimental (tuyau de 2.2mm de diamètre interne), une différence de pressions de 200mbar entre les extrémités de notre système nous permet d'être dans ce régime et de détecter typiquement une goutte par seconde (vitesse de l'ordre du cm/s). Le débit fixé, notre seul levier est la distance que le train va parcourir avant de changer de direction, distance qui est donc proportionnelle à la durée d'un « run ».

Notre étude des transferts pendant l'incubation se fait en deux temps. Tout d'abord, nous souhaitons identifier la source des contaminations : s'il elle est causée par le changement de direction, par la surface continue du tuyau ou par une altération locale du tuyau. Dans un second temps, nous souhaitons évaluer la distribution des contaminations, c'est-à-dire la portée des transferts issus d'une goutte source.

III.3.A Transport d'un train de gouttes durant la génération

Nous n'avons pas encore évalué les échanges entre gouttes pouvant subvenir entre la génération et la mesure de la goutte, et/ou l'incubation. Dans cet objectif, nous avons mesuré l'évolution de la mesure de fluorescence des gouttes suivant immédiatement une goutte source (figure III-12) en fonction de la distance entre la tête de génération et le point de mesure, c'est-à-dire en fonction de la distance parcourue par les gouttes. Ces mesures ont été effectuées dans le cas de tuyaux en FEP (diamètre interne 0.75 et 2.2mm) et PTFE (diamètre interne 2.4mm) pour des gouttes de tailles 0.4µL (0.75mm) et 10 µL (2.2 et 2.4mm) (figure III-26). Les résultats obtenus nous montrent que les contaminations potentielles pouvant avoir lieu lors du transport des gouttes à la génération sont négligeables devant celles causées par la génération et apparaissant à l'extrémité du tuyau, en effet le volume transféré entre deux gouttes semble indépendant de la distance parcourue par ces dernières. En particulier, si des échanges par diffusion de matière fluorescente étaient détectables à la génération, nous aurions dû observer une augmentation des échanges en fonction de la distance parcourue, c'est-à-dire avec le temps écoulé. De même, nous ne mesurons donc pas de mouillage massif de la paroi, la lubrification du tuyau remplit donc bien son rôle car les irrégularités de la surface du tuyau sont plus petites que l'épaisseur du film de lubrification (figure III-27).

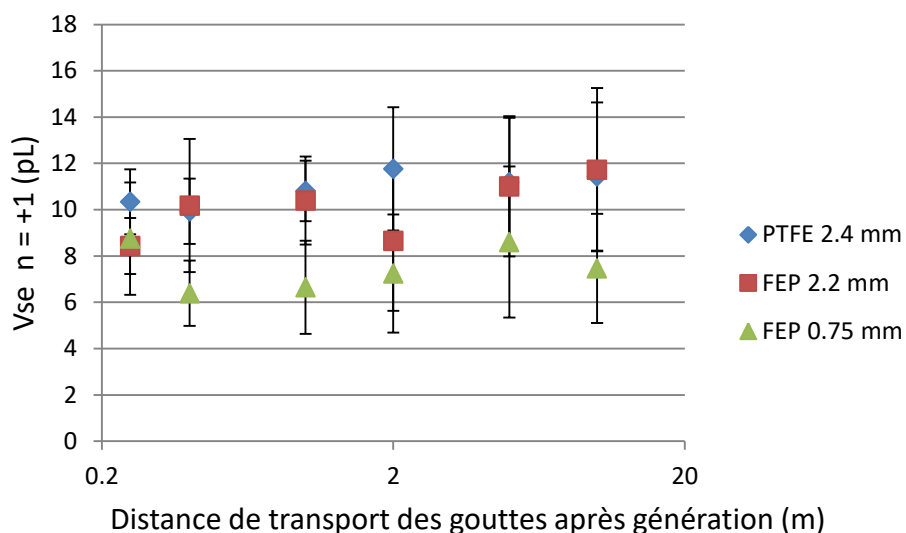


Figure III-26 : Evaluation des contaminations causées par le transport simple du train pour trois tuyaux différents, dans les conditions optimales réduisant les contaminations liées à la génération. Nous ne mesurons pas d'évolution des contaminations sur ces distances.

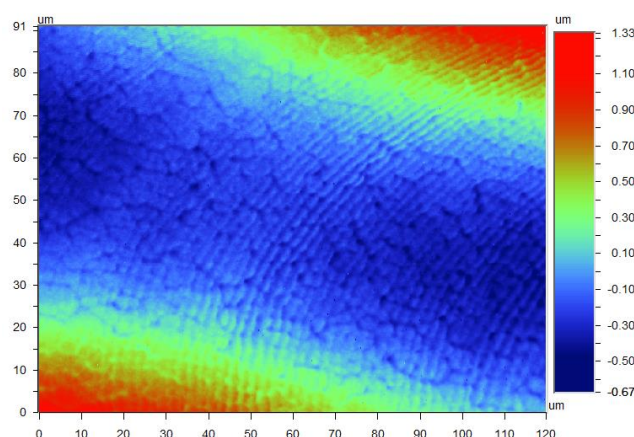


Figure III-27 : Observation de la surface interne d'un tuyau en FEP au profilomètre optique. Les zones de mêmes couleurs sont parallèles à l'axe du tuyau. Nous observons d'une part des « tranchées » de pas et de profondeur micrométrique perpendiculaires à l'axe du tuyau et qui sont provoquées par le procédé d'extrusion du polymère fluoré. D'autre part, nous observons des « nervures » anisotropes. Il s'agit de trace de l'agrégation des particules fluorées lors de la fabrication du polymère. Dans les deux cas, la paroi du tuyau ne varie que sur 1 μ m environ, ce qui est bien en dessous de l'épaisseur du film de lubrification dans notre instrument (autour de 15 μ m).

Aucun échange significatif n'étant donc observé entre la génération et l'incubation (excepté le passage dans une connectique potentielle), nous pouvons nous demander si ces échanges peuvent apparaître sur des plus grande distances ou échelles de temps. Nous évaluerons ainsi ces échanges dans le cas de l'incubation d'un train de gouttes.

III.3.B Portée des transferts pendant l'incubation

Nous observons que les échanges entre gouttes ont lieu continûment, dans des conditions normales (c'est-à-dire hors mouillage massif), et sont réparties de manière homogène le long d'un train. Nous avons évalué les transferts sur de longues distances pour mieux comprendre ces échanges et peut être déterminer si ces échanges sont causés par du mouillage ou la formation de satellites au moment du changement de direction. Pour cela, nous avons évalué les contaminations à conditions constantes pour des expériences sans contamination massive (impliquant un mouillage local du tuyau) après 22h d'incubation. Cette durée permet de détecter les contaminations d'origines biologiques tout en limitant la détection des contaminations biologiques issues des gouttes contaminées. Les mesures ont été effectuées dans le cas où la durée d'un run, T_{run} , est 0.5h pour le FS tout d'abord (figure III-27) .

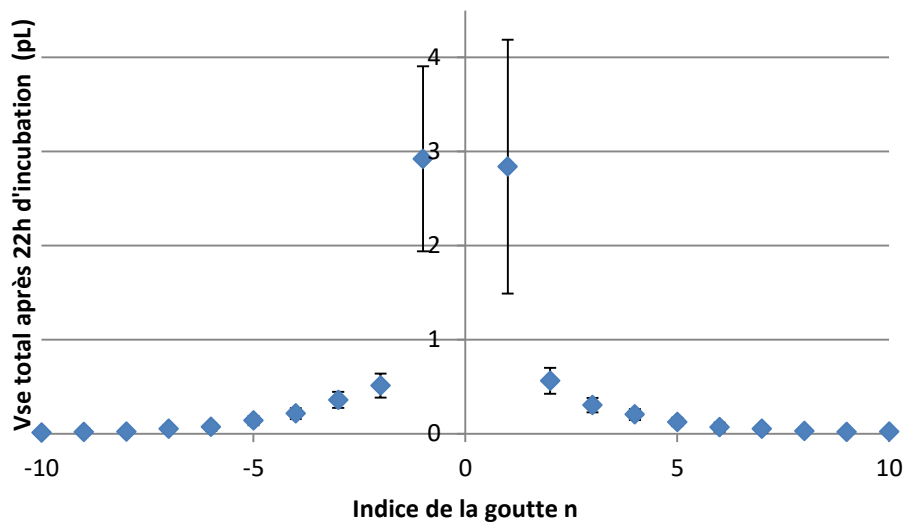


Figure III-27 : Evaluation de l'augmentation des contaminations entre le début et la fin d'une incubation de 22h pour le FS (mesures moyennées sur 4 expériences d'incubation contenant chacune 50 gouttes source). Ces échanges sont symétriques et toujours de proche en proche, les gouttes immédiatement voisines de la goutte source profitent de la majorité des transferts.

Nous observons que les transferts sont similaires en amont et en aval d'une goutte source (nous moyennons leur contribution par la suite) mais aussi que les transferts ont majoritairement lieu avec la goutte $n=1$. Nous avons remarqué que le volume des transferts suit une loi de décroissance exponentielle pour les gouttes les plus éloignées, caractéristique d'un mouillage ou de gouttes satellites présentant une équiprobabilité de fusionner avec chaque goutte. Pour les gouttes les plus proches de la goutte source, le non-respect d'une loi exponentielle serait caractéristique de contaminations par gouttes satellites ne présentant pas une même probabilité de fusionner avec chaque goutte. Une explication possible à ces inégalités de probabilité serait que des gouttes satellites de tailles différentes seraient formées. En effet, leur taille peut affecter leurs chances d'être transportée dans le film de lubrification séparant une goutte de la paroi du tuyau sans coalescer avec ladite goutte.

Dans des conditions similaires ($T_{run}=1h$), nous avons comptabilisé le pourcentage de contaminations biologiques détectables à 22h d'incubation en partant d'un inoculum moyen de 100 bactéries *E. coli* Δflu par goutte source (faible concentration afin d'éviter les contaminations propres à la

génération). Dans ces conditions, les gouttes sources arrivent à saturation après 6h d'incubation tandis que les gouttes contaminées par une unique bactérie seront détectées environ 5h après leur contamination (et arriveront à saturation après 8h). Nous ne détectons donc que les contaminations n'ayant lieu qu'au bout de 17h d'incubation. Nous avons aussi modélisé la distribution attendue des gouttes contaminées à l'aide des résultats obtenus dans le cas du FS et sous l'hypothèse de contaminations uniquement par satellites. Ces résultats nous ont donné des valeurs de volume transféré entre gouttes à chaque changement de direction, nous pouvons donc en déduire le nombre de bactéries transférées, connaissant la courbe de croissance bactérienne des gouttes sources, et donc le nombre de gouttes contaminées à 17h (figure III-28).

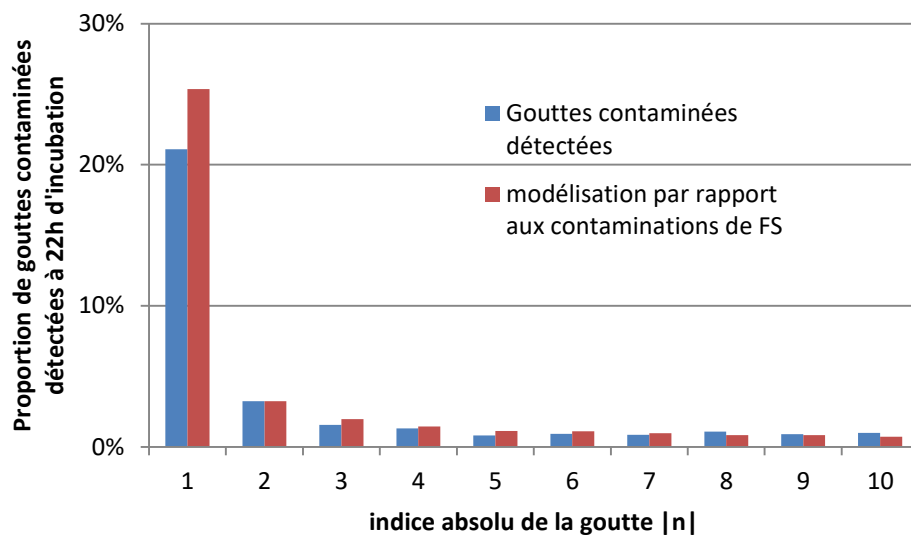


Figure III-28 : Evaluation de la proportion de gouttes contaminées en fonction de leur éloignement de la goutte source la plus proche (mesures effectuées sur 10 incubations contenant chacune 50 gouttes sources). Nous avons modélisé le nombre de contaminations détectées attendues, sachant le volume moyen de milieu transféré au cours du temps et sachant l'évolution de la concentration en bactéries dans chaque goutte au cours du temps. Les résultats et la modélisation correspondent. Le processus de contamination propage donc de la même manière le FS et des bactéries.

Les échanges d'individus et de molécules de FS semblent être soumis aux mêmes mécanismes pendant l'incubation, contrairement aux échanges durant la génération. Il est possible que ces échanges soient essentiellement causés par la formation de gouttes satellites. Des variations dans la taille de ces gouttes satellites pourraient expliquer la distribution particulière des contaminations : les satellites dont le diamètre est très petit devant l'épaisseur du film de lubrification ($\sim 10\mu\text{m}$) auraient une probabilité plus faible de fusionner avec une goutte que les gouttes de même ordre de taille ou plus grande (le V_{se} reçu en moyenne par run par les gouttes $n=1$ équivaut à une sphère de $\sim 5\mu\text{m}$ de diamètre).

III.3.C Origine des transferts

Nous pouvons distinguer les différents types de contaminations selon le moment de leur apparition : s'il s'agit d'échanges continus (comme un mouillage consistant du tuyau ou de diffusion entre gouttes par exemple) ou s'il s'agit d'événements ponctuels (mouillage d'une imperfection localisée sur la surface du tuyau ou au moment du changement de direction). Dans le premier cas, les quantités de matériels transférés augmentent proportionnellement à la distance parcourue par le train, soit le temps écoulé. Dans le second cas, ces quantités augmentent proportionnellement au nombre de va-et-vient dans le tuyau, soit de « runs ». Sous l'hypothèse que les échanges sont constants tout au long de l'incubation, le Vse total (c'est-à-dire le volume transféré depuis le début de l'incubation) devrait suivre la loi suivante :

$$V_{se}(n) = \left(v_1(n) + \frac{v_2(n)}{T_{run}} \right) * t$$

Equation III-4 : où T_{run} est la durée d'un run, $v_1(n)$ le volume transféré par unité de temps vers la goutte d'indice n et $v_2(n)$ le volume transféré par run vers la goutte d'indice n .

Afin d'évaluer les coefficients $v_1(1)$ et $v_2(1)$, nous avons mesuré le $V_{se}(1)=f(t)$ moyen pour différentes valeurs de T_{run} sur 22h (figure III-29). Nous avons remarqué que les échanges sont homogènes dans le train et constants (augmentation linéaire avec le temps des échanges totaux). Néanmoins, dans quelques cas, nous observons une augmentation soudaine de la pente du Vse total sur une partie des gouttes du train, ces résultats ont été retirés de cette étude mais seront débattus plus tard dans cette partie.

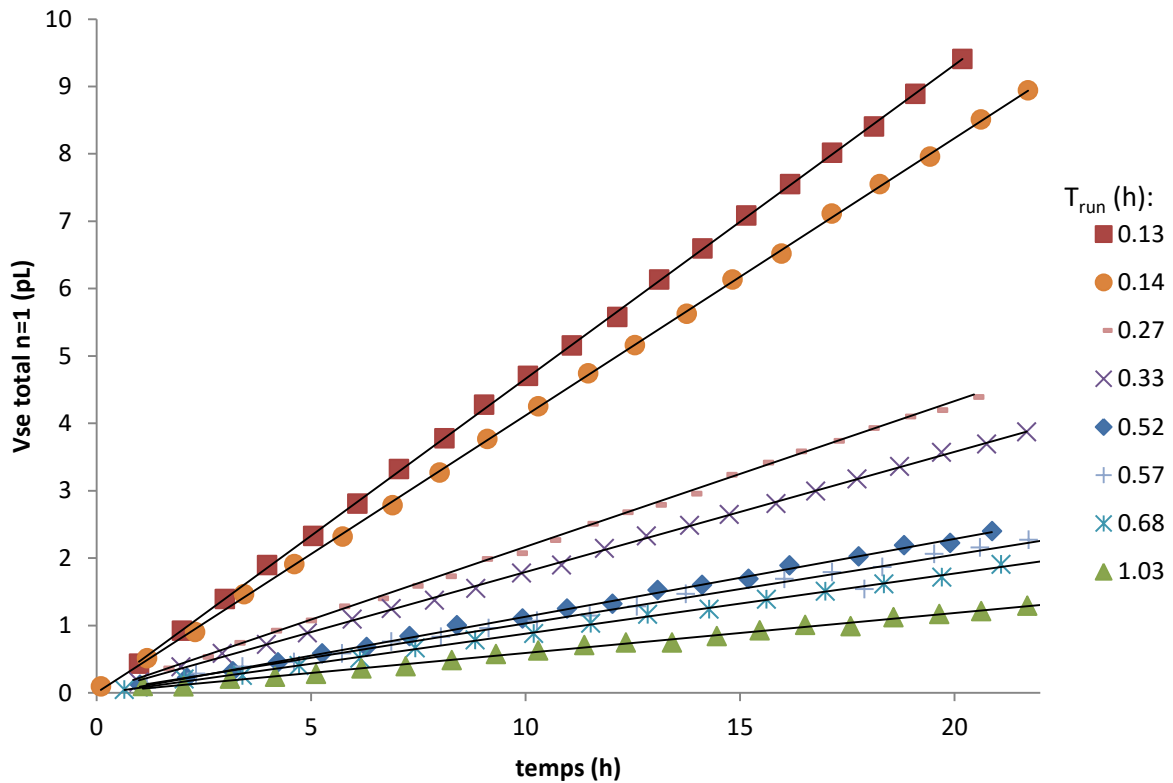


Figure III-29 : Augmentation de la quantité de FS transférée aux gouttes $|n|=1$ en fonction du temps pour 8 trains de gouttes identiques mis en incubation avec des fréquences d'aller-retour différents. Chaque point correspond à la moyenne de 52 gouttes répliquas. Comme nous nous y attendions (équation III-4), toutes ces courbes croissent linéairement avec le temps.

Nous avons ensuite tracé l'augmentation moyenne du Vse total de chacune de ces expériences en fonction de l'inverse de la durée d'un run T_{run} (figure III-30). Nous obtenons bien une fonction affine dont l'ordonnée à l'origine est $v_1(1)$ (en pL/h) et la pente $v_2(1)$ (en pL). Un run durant typiquement entre 10 minutes et 1 heure, nous avons toujours $v_2(1) \gg T_{run} * v_1(1)$. Nous en déduisons que la majorité des échanges entre gouttes ont lieu ponctuellement pendant un run et non tout au long d'un run.

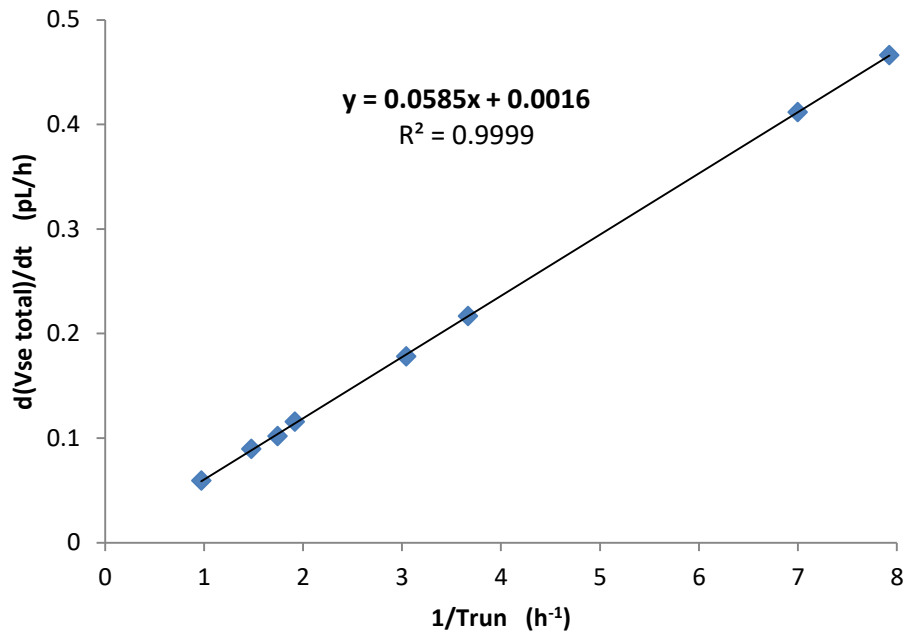


Figure III-30 : Pour chacune des expériences représentées sur la figure III-29, nous traçons la pente moyenne des courbes obtenues en fonction de l'inverse du T_{run} de l'expérience en question. D'après l'équation III-4, nous nous attendons à trouver une fonction affine. C'est effectivement le cas et nous en déduisons : $v_1(1) = 1.6$ nL/h et $v_2(1) = 59$ nL/run.

S'il ne nous est pas possible de distinguer les contaminations par diffusion des contaminations par mouillage continu de la surface du tuyau, comme les transferts continus mesurés de 1.6fL/h sont inférieurs à notre limite de détection (60fL), nous pouvons néanmoins distinguer les échanges ponctuels à un endroit précis du tuyau des échanges ponctuels au moment du changement de direction du train de gouttes. Il suffit pour cela d'étudier la répartition des contaminations dans le train de gouttes, c'est-à-dire si les contaminations sont réparties dans le train de gouttes de manière homogène. Pour un train de 1000 gouttes, nous avons évalué les échanges moyens par groupe de cent gouttes à différents moments de l'incubation pour $T_{run} = 0.5h$ (figure III-31). Nous observons que les échanges sont assez homogènes sur l'ensemble du train jusque 20h d'incubation, mais un événement est survenu entre 20h et 25h qui a modifié la dynamique d'échange entre les gouttes de $n^{\circ} > 200$. Il est possible qu'un élément local dans le tuyau provoque alors des contaminations supplémentaires et modifie donc l'augmentation du volume échangé.

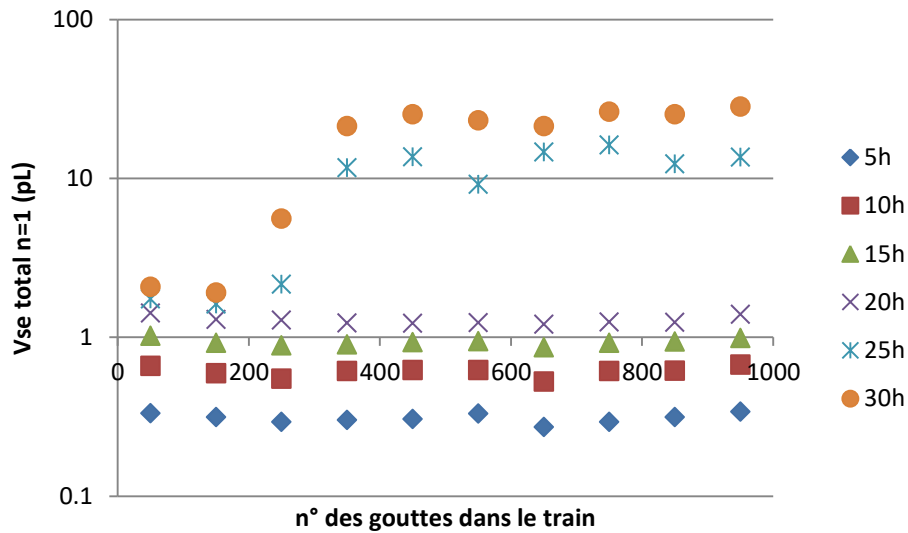


Figure III-31 : Répartition des contaminations dans un train de gouttes à différents moments de son incubation ($T_{run} = 0.5h$). Si pendant les 20 premières heures le signal est cohérent avec ceux de la figure III-29, nous observons à 25h que les deux tiers du train sont massivement plus contaminés que le reste du train et que ce phénomène s'accroît à 30h.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons formé un nouveau train identique dans le même tuyau, sans le nettoyer. Ce train a été incubé sans effectuer de va-et-vient sur l'ensemble du train : nous effectuons des runs de 30s pour permettre aux mêmes gouttes de toujours être exposées aux mêmes zones du tuyau. Le centre du train est ainsi maintenu à proximité du détecteur, et nous effectuons à certains moments une mesure complète de la fluorescence du train de gouttes (figure III-32). Nous détectons ainsi effectivement la présence initiale d'un élément contaminant fixé sur le tuyau contaminant les gouttes autour de la n°750, puis un second élément semble apparaître après 10h d'incubation autour de la goutte n°150, enfin un dernier élément contaminant semble apparaître autour de la goutte n°550.

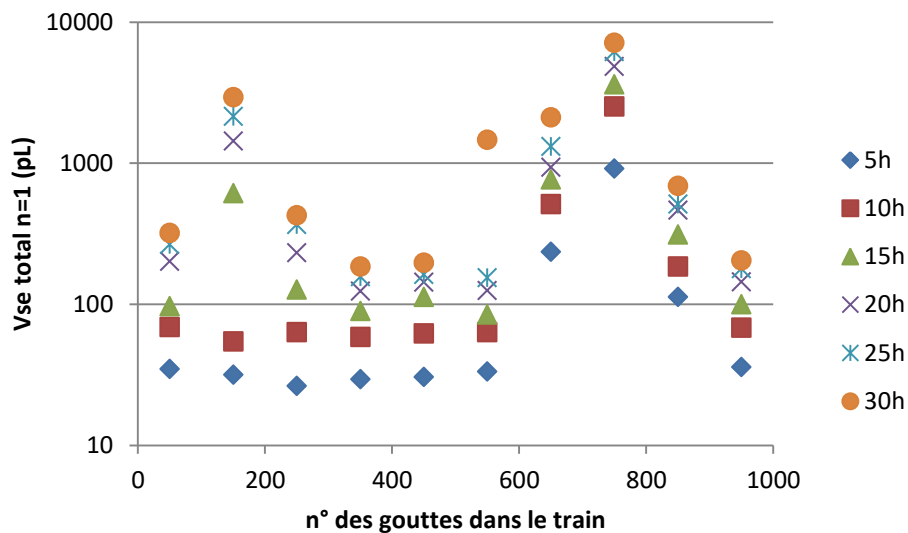


Figure III-32 : Répartition des contaminations dans un train de gouttes à différents moments de son incubation ($T_{run} = 0.008h$). Le tuyau est le même que pour l'expérience précédente (figure III-31) et n'a pas été nettoyé. Nous observons dès le départ de l'incubation des contaminations massives localisées qui ont la même origine que les contaminations de la figure III-31. D'autres contaminations apparaissent par la suite. Il existe donc des défauts localisés sur le tuyau qui induisent ces contaminations et s'accroissent.

Nous pouvons donc conclure de cette expérience que les contaminations initiées par un défaut du tuyau sont d'un ordre de grandeur différent de celles naturellement observées et qu'elles apparaissent au cours d'une expérience avec une faible probabilité par run. Une fois qu'un tel élément contaminant est initié (comme un volume de liquide piégé sur la surface du tuyau), celui-ci va induire des échanges entre gouttes massivement et de manière consistante. Un nettoyage complet du tuyau permet d'éliminer ces éléments contaminants, mais d'autres apparaîtront à nouveau aléatoirement. Si ces contaminations semblent liées à des phénomènes de mouillage, les échanges ayant majoritairement lieu pour un tuyau nettoyé semble être imputables au changement de direction du train de gouttes.

Quant aux transferts obtenus dans des conditions normales, la taille caractéristique de volume de transfert peut correspondre à la taille d'un satellite formé par le changement de direction des gouttes dans le tuyau. Le séparateur d'air peut en effet décrocher un volume de liquide car, avançant plus rapidement que le bioréacteur, il va au changement de direction du train diminuer son contact avec la goutte qui la précédait pour suivre l'autre goutte qui l'encadre. La création d'une goutte satellite implique la rupture d'un cylindre fin de liquide et régulièrement la formation d'une goutte satellite secondaire de taille plus petite. Cette petite goutte satellite secondaire pourrait expliquer la persistance des contaminations sur de longues distances, en effet la taille caractéristique des gouttes secondaires est nécessairement beaucoup plus petite devant l'épaisseur du film de lubrification.

Les contaminations observées sont donc de deux ordres : des contaminations de fort volume mais de faible portée et des contaminations de faible volume mais de forte portée. L'évaluation distincte de ces deux types de contaminations peut être nécessaire pour modéliser fidèlement les transferts entre populations durant l'incubation. Le point important est que ces contaminations restent essentiellement de proche en proche, ce qui permet à la métapopulation de conserver une structure d'échange linéaire peu ramifiée. Ainsi le temps de coalescence entre deux populations distinctes sera d'autant plus grand que la distance séparant ces deux bioréacteurs sera élevée. Cette propriété permet, dans une certaine mesure, aux populations de diverger exponentiellement les unes des autres.

Dans le cas d'une simple expérience d'analyse phénotypique, la contribution de ces échanges entre populations est d'autant plus faible que les populations en présence présentent un fitness similaire. Dans le cas contraire, les populations présentant le meilleur fitness pourraient contaminer un milieu dont la population n'est pas encore arrivée à saturation et affecter significativement la population finale. Dans le cas d'une expérience de culture sur le long terme, cet effet peut se révéler problématique si le fitness des populations devient hétérogène. Dans les conditions standard appliquées dans nos expériences, c'est-à-dire un cycle expérimental tous les 24h, en moyenne une goutte ne recevra qu'une bactérie étrangère par cycle. Cette bactérie présente peu de chances d'être transférée à la prochaine génération de goutte après dilution, à moins qu'elle ne présente un fitness particulièrement important.

Cet effet peut encore être diminué en imposant une concentration moyenne des populations moins importante. Il peut s'agir de diminuer les possibilités d'accueil du milieu de culture en réduisant un des nutriments, de réduire le bottle neck (soit augmenter le facteur de dilution) ou d'augmenter la fréquence des cycles (afin de diminuer la durée de la phase saturée). Le choix à effectuer entre ces différentes stratégies est à mettre en relation avec les objectifs de l'expérience, leur faisabilité technique, mais aussi les autres sources de contaminations.

III.3.D Application

En guise d'ouverture sur les applications possibles de cette étude, nous discuterons brièvement de son utilisation avec la machine développée par Millidrop. Cet instrument est utilisé pour phénotyper des bactéries. C'est-à-dire qu'on y incube un train de gouttes contenant un nombre très faible de bactéries. Leur répartition suit donc une loi de Poisson avec généralement λ de l'ordre de 0.3. Le but de cette opération est de s'assurer que chaque bactérie est seule initialement dans sa goutte. Ainsi la courbe de croissance mesurée par l'appareil est celle d'une culture monoclonale [20]. En analysant ces courbes de croissance, l'expérimentateur est capable de distinguer les différents phénotypes présents dans l'échantillon qu'il analyse, d'évaluer leur proportion et de les récupérer.

Seulement, comme beaucoup de gouttes sont inoccupées, il est probable que beaucoup d'entre-elles soient contaminées pendant l'incubation. Généralement, il est facile de distinguer les contaminations des inocula initiaux car leur temps de détection est très différent. Mais, dans le cas d'une population diversifiée en phénotype, certaines cultures devraient croître plus lentement que les contaminations issues des cultures croissant normalement. Dans ce cas, il n'est pas forcément possible de les distinguer. Nous pouvons seulement évaluer un intervalle de confiance. C'est-à-dire, connaissant les courbes de croissance des gouttes environnantes, nous pouvons estimer la probabilité qu'avait la goutte d'être contaminée.

La stratégie qui a été choisie et sur laquelle nous travaillons est d'évaluer, pour une machine et un tuyau donné, la dynamique de contamination issue d'un train inoculé avec λ très faible (de l'ordre de 0.01) afin de s'assurer non seulement que les bactéries sont seules dans leur goutte au départ, mais aussi que ces cultures sont suffisamment éloignées pour que leur dynamique de contamination interfère peu. En guise de test, une première expérience a été réalisée sur une machine Millidrop et nous livre des informations intéressantes sur la machine (figure III-33).

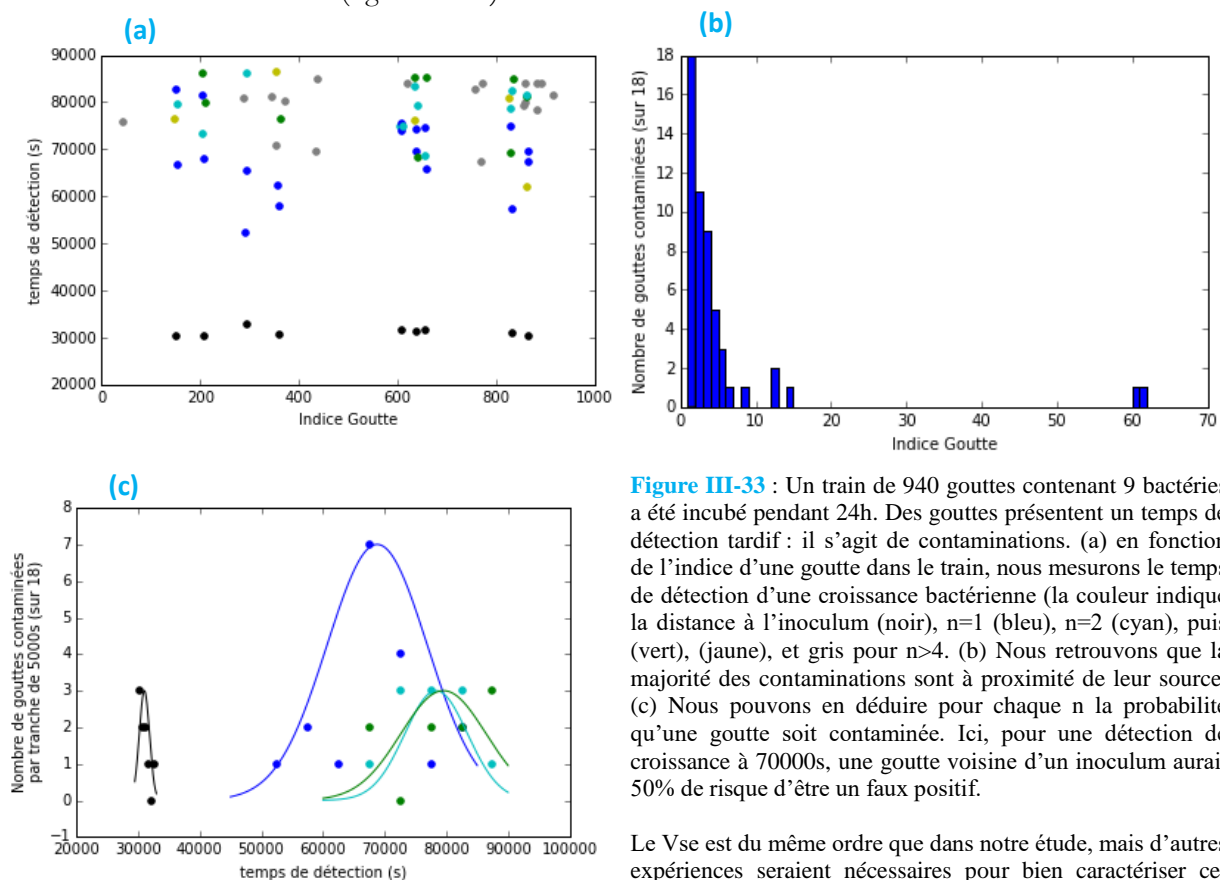


Figure III-33 : Un train de 940 gouttes contenant 9 bactéries a été incubé pendant 24h. Des gouttes présentent un temps de détection tardif : il s'agit de contaminations. (a) en fonction de l'indice d'une goutte dans le train, nous mesurons le temps de détection d'une croissance bactérienne (la couleur indique la distance à l'inoculum (noir), $n=1$ (bleu), $n=2$ (cyan), puis (vert), (jaune), et gris pour $n>4$). (b) Nous retrouvons que la majorité des contaminations sont à proximité de leur source. (c) Nous pouvons en déduire pour chaque n la probabilité qu'une goutte soit contaminée. Ici, pour une détection de croissance à 70000s, une goutte voisine d'un inoculum aurait 50% de risque d'être un faux positif.

Le Vse est du même ordre que dans notre étude, mais d'autres expériences seraient nécessaires pour bien caractériser cet instrument.

III.4 Conclusion

Nous avons identifié dans ce chapitre différentes sources potentielles d'échanges chimiques ou biologiques entre conteneurs dans notre système millifluidique. Ces sources sont toujours liées à des étapes de manipulation du train de gouttes : préparation d'une plaque multi-puits, génération du train, son transport, son passage dans des connectiques, incubation du train de gouttes. Lors d'une utilisation classique du dispositif millifluidique à des fins analytiques, les premières étapes peuvent présenter des échanges faibles à condition de partir de faibles concentrations en individus, tandis que l'impact des échanges pendant l'incubation peut généralement être négligé. Cependant, si nous souhaitons réaliser une expérience de culture en millifluidique long terme, il est nécessaire de régulièrement entrer et sortir un train de gouttes du dispositif. Travailler à très faible concentration à la génération signifie imposer un bottle neck très fort à nos lignées de cultures de microorganisme, ces lignées sont donc très sensibles à la dérive génétique et nous conserverons un levier assez faible sur ce paramètre de sélection. En revanche, sortir le train de gouttes en dehors du dispositif expose la métapopulation aux mêmes échanges qu'à la génération sauf que nos bioréacteurs sont nécessairement très concentrés en individus : les échanges entre populations seront donc importants (un à deux ordres de grandeur plus grands que les échanges dus à l'incubation).

Ces échanges systématiques, même optimisés à l'aide des paramètres expérimentaux optimaux que nous avons déterminés durant cette étude, auront un fort impact sur le long terme en homogénéisant la métapopulation, réduisant ainsi les bénéfices de la compartimentalisation. A ces contaminations internes à la métapopulation, nous devons aussi ajouter qu'à chaque fois que nous sortons les bioréacteurs hors du dispositif millifluidique, ceux-ci sont exposés aux germes du monde extérieur, il est donc très probable que sur le long terme des contaminations extérieures viennent envahir le dispositif et donc affecter le résultat de notre processus de sélection.

Les échanges entre bioréacteurs demeurent un problème majeur contre lequel nous devons lutter dans tout système d'évolution dirigée. Il est en effet nécessaire de pouvoir faire émerger de la diversité entre populations afin de pouvoir les sélectionner avantageusement ; une homogénéisation de la métapopulation est donc à éviter. La mise en évidence de la diversité inter-populations d'une métapopulation fera l'objet du chapitre suivant, nous adapterons en effet la technologie millifluidique pour permettre à des cultures de manifester leur diversité acquise.

Chapitre IV

Mise en évidence d'une forme de diversité

IV Mise en évidence d'une forme de diversité

Pour effectuer une sélection artificielle sur des populations, il nous faut pouvoir les discriminer, c'est-à-dire être capable de détecter d'infimes différences dans la métapopulation afin de pouvoir favoriser l'émergence d'individus ou d'une organisation interne à la population pouvant présenter des bénéfices vis-à-vis de nos attentes. Généralement, nous ne pouvons pas nous attendre à une forte diversité de réponses des populations lorsqu'elles sont génétiquement proches et croissent sans contrainte (sans sélection naturelle ou aléatoire) dans un même milieu auquel elles sont parfaitement adaptées.

La méthode la plus sûre pour faire apparaître une forme de diversité qui nous permettrait de sélectionner les populations serait donc tout d'abord de ne pas imposer de sélection et de cultiver continuellement de manière indépendante nos différentes lignées de populations. Ces dernières vont, en effet accumuler des mutations (au sens large) et diverger les unes des autres et donc se diversifier. Il n'est néanmoins pas évident de différencier telles-que, instantanément, ces populations qui vont lentement évoluer dans un milieu constant. Des dynamiques très longues de fixation d'un nouveau phénotype ou de mutants au sein d'une population ont ainsi été mises en évidence lors de cultures à long terme en parallèle dans des conditions pourtant nouvelles et donc diversifiantes [75][35]. De plus, les échanges entre populations peuvent réduire leur divergence et donc l'observable de diversité.

La méthode la plus immédiate pour mettre en évidence la diversité existante ou accumulée (lors des cultures parallèles des populations) serait donc de modifier les conditions de cultures : confronter les populations à un milieu auquel elles ne sont pas encore parfaitement adaptées. Ce changement d'environnement va stresser les individus de la population et va donc permettre de dégager une forte diversité de fitness interne au sein des populations et entre elles. Une sélection naturelle interne à la population [97][69], ou une réorganisation de la population [21][51], conditionnées par un stress artificiel peut nous permettre ensuite de sélectionner les populations répondant à un critère précis. Cette méthode peut être appliquée à des fins analytiques, dans ce cas le stress est appliqué sur un échantillon de chaque lignée afin d'évaluer leurs propriétés sans leur imposer de sélection interne, ou à des fins évolutives en tirant partie du bottle neck imposé par le stress de sélection.

Pour bien faire apparaître cette diversité, il faut donc choisir un stress capable de discriminer les populations sans les faire toutes réagir de la même manière. Généralement, pour un type de stress donné, il existe plusieurs régimes : un régime pour lequel le stress n'affecte pas les populations, un régime qui élimine les populations, et enfin un régime intermédiaire où les populations peuvent réagir différemment les unes des autres. Il s'agit donc de choisir le bon stress discriminant en évaluant son impact.

La technologie millifluidique semble particulièrement adaptée pour lire la diversité de réponses issue de ce stress. Elle a ainsi déjà démontré sa capacité à mesurer quantitativement la réponse de petites populations à un gradient de stress en antibiotique [5]. Nous en avons redimensionné la taille des échantillons dans l'espoir d'observer des réponses hétérogènes, mais l'adaptation à un stress demeure stochastique. Il est donc primordial d'avoir un très grand nombre de répliquas pour espérer détecter des événements rares. Notre outil millifluidique semble être effectivement le bon outil pour pratiquer une évaluation de la diversification d'une lignée bactérienne.

IV.1 Imposer un stress discriminant : la résistance à un antibiotique

Le stress le plus classiquement étudié en laboratoire sur les bactéries est celui d'un antibiotique. Leurs populations présentent des mécanismes de résistance stochastiques et variés que nous pouvons comparer à l'aide de leur MIC, la concentration minimale d'inhibition de croissance de la population. Nous pouvons nous attendre à observer un maximum de diversité des réponses de croissance des populations pour une gamme de concentrations proche du MIC, car cette concentration en antibiotique est suffisante pour stresser significativement une population (et donc favoriser des mutants, des phénotypes, ou un mécanisme communautaire de résistance) sans nécessairement inhiber la croissance de tous ses individus [43][70]. Nous considérons ainsi que le principal facteur de l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques est causé par des stress sub-MIC [2][20]. L'étude de la variabilité de ces réponses représente ainsi un enjeu sanitaire crucial pour doser efficacement les traitements contre les infections bactériennes. En effet, une infection bactérienne d'un être vivant présente une forte diversité qui est imposée par la structuration spatiale de cette métapopulation qui compartimente d'une part les sous-populations bactériennes, et d'autre part la distribution en antibiotique qui n'est pas nécessairement homogène, ce qui impose donc des stress différents aux sous-populations et donc des pressions de sélection fluctuantes [9][4].

IV.1.A Croissance à faible inoculum

Les méthodes de la mesure d'un MIC ou de réponse à une pression antibiotique sont généralement standardisées de la même manière [10], nous mettons en présence dans un volume fixé :

- Une population bactérienne de concentration connue
- Un antibiotique de concentration connue
- Un milieu de croissance standardisé

Nous mesurons ensuite l'activité microbienne après un temps fixé. Pour cela, soit nous avons au préalable ajouté au milieu un marqueur d'activité biologique (comme la résazurine), soit nous mesurons la biomasse finale de la population (en mesurant la fluorescence ou la densité optique de la population). Dans ce dernier cas, nous avons la capacité de distinguer et classer le succès de résistance de chaque population. De plus, nous évitons les cas où une population est détruite de manière suffisamment lente par un antibiotique pour avoir une activité biologique positive.

Le protocole standard (figure IV-1) ainsi appliqué avec notre instrument millifluidique est de former un train de 1140 gouttes de 10 μ L inoculée à partir d'un mélange macroscopique déjà effectué contenant le milieu (M9 enrichi en glucose à 20mM), un inoculum connu de bactérie (ici *E. coli* Δ *flu*) et une concentration connue d'antibiotique. Le train est incubé, nous mesurons le signal de fluorescence de chaque goutte au cours du temps, et en particulier la fluorescence finale de la population (généralement à 22h pour un inoculum d'environ 100 bactéries par gouttes). La distribution de ce signal de fluorescence nous informe ainsi sur la diversité de la réponse à un stress antibiotique. Des 1140 gouttes initialement générées, toutes ne sont pas analysables : certaines peuvent avoir coalescé, présenter un signal non conventionnel (contamination, artefact), et les gouttes présentes aux extrémités du train ne sont pas oxygénées dans les mêmes conditions. Nous sélectionnons systématiquement les 1000 gouttes les plus robustes pour analyse.

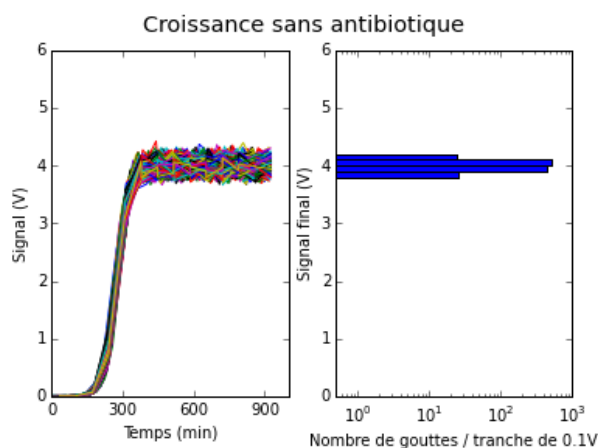
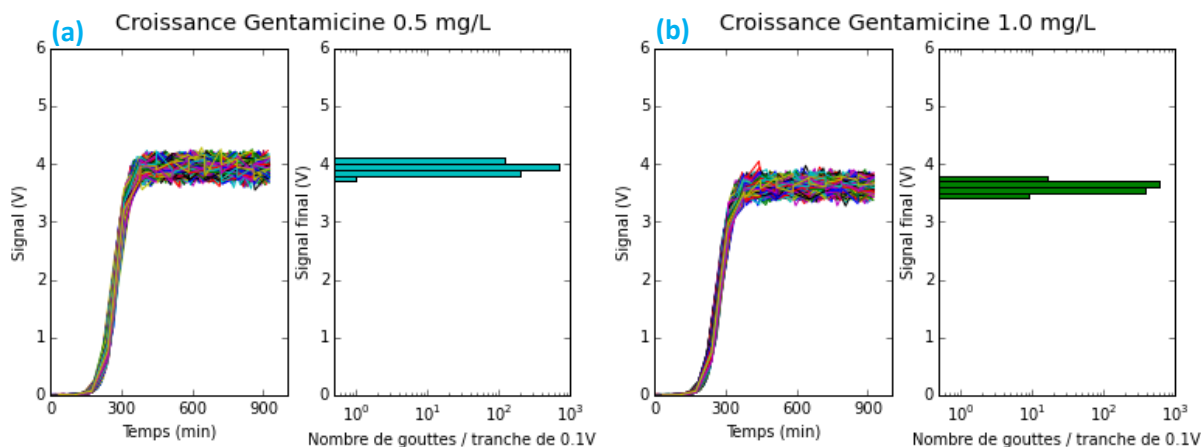


Figure IV-1 : Signal de fluorescence de 1000 gouttes de 10 μ L incubées à 37°C contenant initialement 100 bactéries *E. coli* Δ *flu*, et distribution de leur signal moyen final (à 900min). Pour des gouttes de 10 μ L, nous rappelons qu'un signal de fluorescence de 4V correspond à une population d'environ 10⁷ bactéries. Nous observons dans ces conditions que la biomasse finale dans les différentes cultures est assez homogène, comme nous nous y attendons. Une des sources possible de variation de la biomasse est la compétition, entre les gouttes, pour l'oxygène disponible dans les séparateurs.

Nous avons mesuré cette diversité pour la souche *E. coli* Δ *flu* confrontée à la gentamicine à laquelle elle n'est pas résistante. Son MIC, mesuré sur plaque 96 puits dans les conditions standard (inoculum de 100 bactéries par puits de 200 μ L), est compris entre 2 et 4 mg/L. Pour un inoculum de 100 individus par goutte et des concentrations autour du MIC, comprises entre 0.5 et 3.0 mg/L, nous avons mesuré le signal de fluorescence des gouttes incubées à 37°C (figure IV-2).

L'apparition de résistances à la gentamicine a généralement lieu dans le milieu vétérinaire [77] où il a longtemps été utilisé en combinant son action à celle des bêta-lactames. Depuis quelques années, la résistance *E. coli* à la gentamicine apparaît de plus en plus dans le milieu hospitalier via l'évolution d'un gène de résistance de la même classe que cet antibiotique. Notre souche est résistante à l'ampicilline mais aussi à la kanamycine, un autre aminoside 4,6 disubstitué, il est donc possible que des mutations permettent à certains individus de résister à la gentamicine. De tels mécanismes sont ainsi bien décrits pour les bêta-lactames [78], ils manifestent l'existence de chemins adaptatifs privilégiés lors de l'adaptation à un antibiotique. Comme les mécanismes de résistance possibles sont égoïstes, un mutant résistant devrait croître, seul, dans des conditions très stressantes, et serait ainsi identifiable.



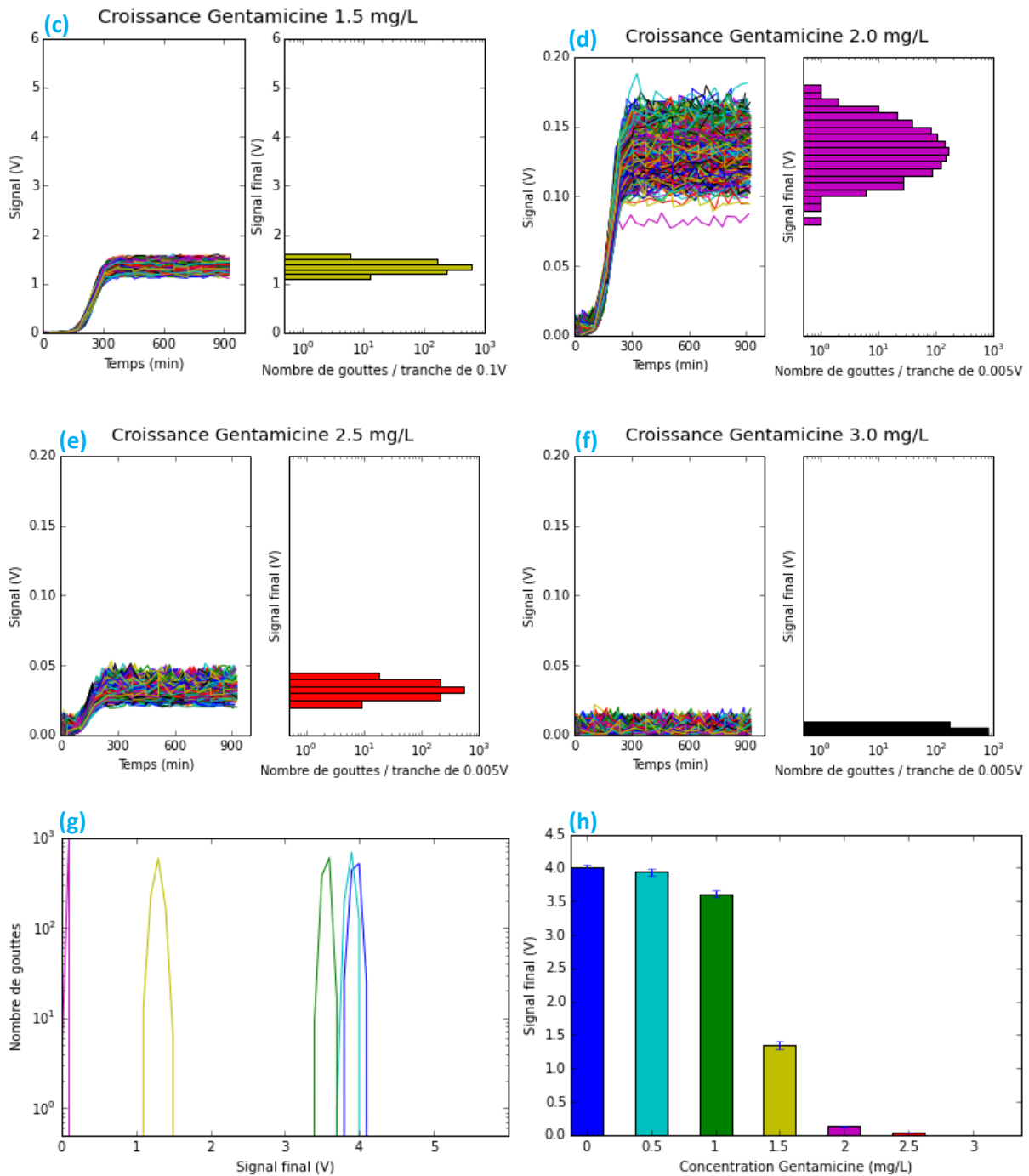


Figure IV-2 : (a-f) Signal de fluorescence de 1000 gouttes incubées à 37°C contenant initialement 100 bactéries *E. coli* Δflu en présence de Gentamicine à des concentrations de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 et 3.0 mg/L, et distribution de leur signal moyen final (à 900min). Nous observons que le taux de croissance moyen et que le lag sont invariants, mais que la valeur de la biomasse finale décroît quand on augmente la concentration en gentamicine. L'écart-type de cette biomasse décroît lui aussi avec l'augmentation du stress, mais sa valeur rapportée sur la biomasse augmente, elle, de plus en plus. Nous comparons les distributions et les valeurs de la biomasse finale pour les différentes concentrations en gentamicine sur les deux dernières figures. (g) Distribution des signaux de fluorescence moyens finaux correspondant. (h) Influence de la concentration en Gentamicine sur le signal final. La diminution de la biomasse finale sous un stress sub-MIC est un résultat déjà observé [5][59], les bactéries consommeraient en effet plus de glucose pour résister au stress.

NB : Tout au long de ce chapitre, nous conserverons le même code couleur correspondant à chaque stress antibiotique (bleu : 0 mg/L ; 0.5 mg/L : cyan ; 1.0 mg/L : vert ; 1.5 mg/L : jaune ; 2.0 mg/L : magenta ; 2.5 mg/L : rouge ; 3.0 mg/L : noir ; 3.5 mg/L : gris).

Nous observons ainsi qu'à concentration en antibiotique donnée, les différentes populations se comportent de manière très similaire, la diversité de réponse semble donc très faible. Ceci pouvant être imputable à la taille des inoculas qui sont trop faibles pour que la métapopulation possède une diversité préexistante suffisante pour l'exprimer. A titre de comparaison, si nous recherchons l'existence d'un mutant dans la métapopulation présentant une résistance légèrement supérieure à l'antibiotique (ou du moins permettant d'affecter la biomasse finale), un mutant correspondant à une mutation donnée n'a qu'une probabilité de 10^{-9} d'apparaître alors que notre métapopulation n'est initialement composée que de 10^5 individus au départ. Il est donc peu probable d'observer la moindre modification de la distribution de la biomasse finale.

IV.1.B Effet de la taille de l'inoculum

Une possibilité serait d'augmenter la taille de l'inoculum. Nous avons ainsi mesuré pour une concentration fixée de 2mg/L en gentamicine la distribution de la biomasse finale en fonction de la taille de l'inoculum (figure IV-3). Si la valeur de la biomasse finale augmente, sa distribution ne semble pas être affectée. La légère augmentation de la valeur de la biomasse finale reflète la légère augmentation du MIC avec l'augmentation de l'inoculum [94][5]. De fait, en maintenant une concentration fixe en antibiotique nous nous éloignons du MIC et favorisons une réponse homogène au stress appliqué.

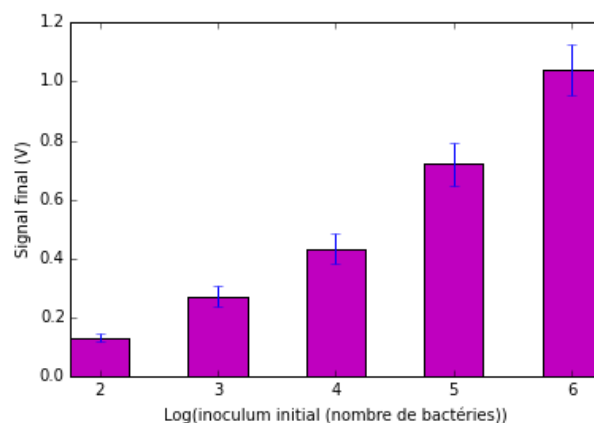


Figure IV-3 : Signal final (à 900min) de fluorescence de 1000 gouttes incubées à 37°C en présence de gentamicine à une concentration de 2.0 mg/L contenant initialement 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 et 10^6 bactéries *E. coli Aflu* par goutte. Nous observons une croissance nette, constante, et reproductible de la valeur de la biomasse finale avec l'augmentation de la taille de l'inoculum. Si ces résultats ne montrent pas que le MIC augmente significativement, ils mettent en évidence néanmoins un net effet de la taille de l'inoculum sur le comportement sub-MIC de cultures de bactéries. L'écart-type sur la valeur de la biomasse finale reste faible, nous n'observons donc pas de diversification des comportements de résistance à la gentamicine.

Nous avons donc mesuré la distribution de la biomasse finale en fonction de la concentration en antibiotique autour du MIC pour un inoculum fixe proche de la saturation : 0.1 bactéries/pL, soit un million de bactéries initialement dans chaque goutte de 10 μ L (figure IV-4). Ainsi même les événements les plus rares (comme des mutations génétiques bénéficiaires) ont de fortes chances d'avoir eu lieu avant la préparation du train de gouttes (qui contient donc 10^9 bactérie sur l'ensemble des échantillons), et on peut donc s'attendre à observer une diversité très différente de résistances des gouttes. En effet, si plusieurs mutations (présentant chacune en moyenne une probabilité de l'ordre de 10^{-9} d'apparaître) de résistance existent, il est assez probable que quelques-unes soient présentes dans le train initial.

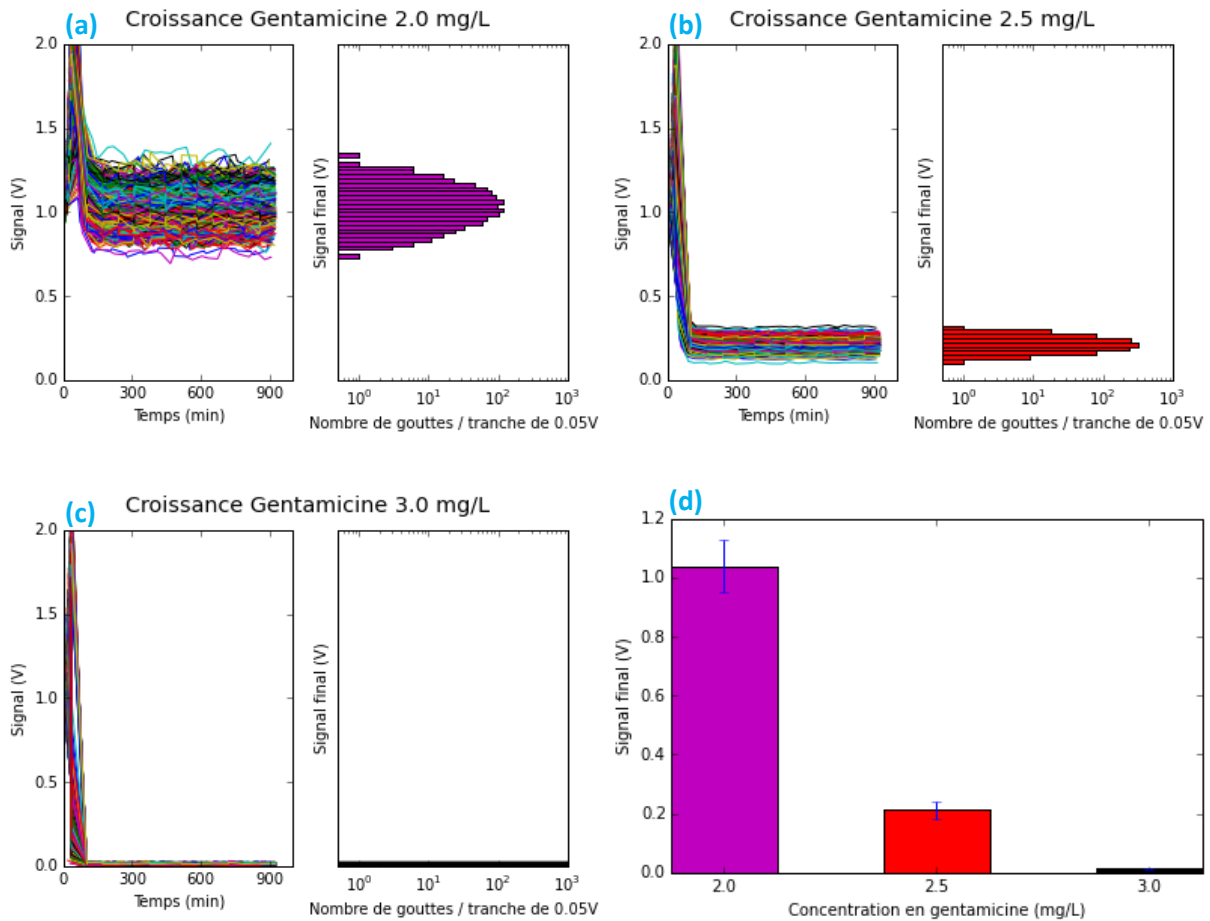


Figure IV-4 : (a-c) Signal de fluorescence de 1000 gouttes incubées à 37°C, en présence de gentamicine à des concentrations de 2.0, 2.5 et 3.0 mg/L, contenant initialement 10^6 bactéries *E. coli Aflu*, et distribution de leur signal moyen final. Nous observons que le taux de croissance est inchangé, mais, que, comme sur la figure V-2, la valeur de la biomasse finale diminue avec l'augmentation de la concentration en gentamicine. La valeur mesurée du MIC est toujours de 3.0 mg/L (pas de croissance observée) tandis que la valeur de la biomasse finale pour 2.0 et 2.5 mg/L est plus élevée que pour un inoculum de 10^2 bactéries/goutte. L'écart-type de la distribution des réponses, rapporté sur la valeur moyenne de la biomasse, ne semble pas, lui, avoir varié en augmentant la taille de l'inoculum. En particulier, aucune croissance tardive, caractéristique de l'émergence d'une sous population (mutante par exemple) n'est observée. Nous pouvons faire trois remarques supplémentaires sur ces courbes de croissance : indépendamment de la présence d'antibiotique, la population de bactéries croît immédiatement avec un temps de division normal pendant quelques générations ; après ces quelques générations, la biomasse de la population tend vers la biomasse finale sous l'effet de l'antibiotique ; le signal de fluorescence décroît avec la mort des bactéries, car le fluorophore se dégrade et les bactéries mortes sédimentent dans le bas de la goutte, hors du point de mesure. (d) Evolution de leur signal final moyen (à 900min) en fonction de la concentration en gentamicine.

Nous observons ainsi un léger élargissement de la distribution des réponses, en particulier pour les concentrations supérieures au MIC, mais nous n'observons pas de réelles fluctuations de réponses. Les populations répondent similairement. Une explication possible est qu'une certaine forme de diversité transférable (génétique ou non) s'est établie avant la fabrication du train et que celle-ci a été dispersée de manière homogène dans tous les bioréacteurs. Les caractéristiques acquises qui pourraient conditionner la réponse des populations au stress antibiotique sont donc moyennées sur l'ensemble des échantillons.

IV.1.C Test de fluctuation

Afin de faire émerger une diversité de réponses au sein de la métapopulation, la solution serait de cultiver indépendamment les bioréacteurs à partir d'un petit inoculum issu directement du clone initial et d'imposer, une fois la croissance terminée, un stress antibiotique tout en nourrissant la population. Il s'agirait donc de faire une forme de test de fluctuation, test introduit par Luria et Delbrück [61], ce test nous permettrait de plus, via l'analyse de la distribution de la réponse, d'évaluer les mutations acquises par les bioréacteurs. En effet, en distinguant les populations présentant une réponse uniforme de celles présentant une réponse plus variée, nous pouvons identifier les populations où au moins un événement est survenu. Nous utilisons donc la version simplifiée de la mesure du taux de mutation via un test de fluctuation [az]. En considérant qu'il s'agit d'événements rares, leur répartition dans la métapopulation suit une loi de Poisson, et nous pouvons estimer leur nombre et le taux de mutation par division μ en évaluant la proportion de populations répondant normalement (figure IV-5) à l'aide de l'équation IV-1.

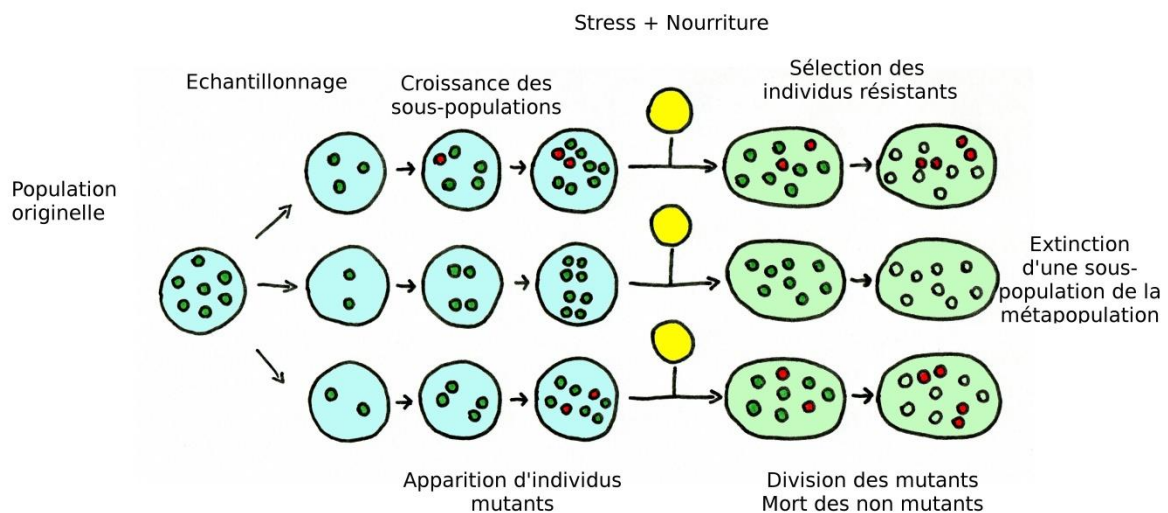


Figure IV-5 : Principe d'un test de fluctuation : une population originelle est échantillonnée en n sous-populations indépendantes, formée d'un inoculum moyen initial de i individus, et formant une NEM. Ces dernières sont incubées, laissant les individus se multiplier alors que des mutations peuvent apparaître. Elles sont ensuite stressées en présence de nourriture. Les mutations apportant une résistance au stress (en rouge) permettent aux mutants de croître, tandis que les individus non mutants (en vert) sont inactivés (ceci sous l'hypothèse d'une réponse binaire au stress). En comptant le nombre de sous-populations survivantes à l'issue de l'expérience, nous pouvons estimer le nombre de mutations apparues lors de la phase initiale de croissance et donc le taux de mutation en réponse au stress.

$$\mu = \frac{\ln(n/n_e)}{i_s - i_0} \pm \frac{\sqrt{n_e^{-1} - n^{-1}}}{i_s - i_0}$$

Equation IV-1 : Estimation du taux de mutation μ (probabilité d'apparition d'une mutation lors d'une division) en réponse à un stress calculé à l'aide d'un test de fluctuation de réponse binaire, où n est le nombre de sous-populations, n_e le nombre de sous-populations éteintes post-stress, i_0 et i_s les inocula moyens par sous-population post-échantillonnage et pré-stress. Dans le cas de la figure IV-5, où 3 mutations sont apparues pour 18 divisions (on s'attend donc à $\mu \sim 3/18 = 0.17$), on calcule ainsi $\mu = \ln(3/1)/(8.3 - 2.3) = 0.18 \pm 0.14$ mutation/division.

Afin que nos résultats soient les plus fiables possibles, nous devons respecter certaines conditions sur la taille de la métapopulation. Cherchant à détecter des événements rares, nous avons intérêt à multiplier le nombre d'échantillons de populations testés et nous assurer qu'ils ont un comportement homogène préalablement au stress. Pour cela, nous devons nous assurer que l'inoculum initial moyen des populations est suffisamment grand pour que toutes les populations présentent une taille relativement homogène et surtout non nulle. Nous considérons généralement que l'inoculum doit être constitué d'au moins 10 individus (dans 95% des cas, 1000 populations contiendront initialement toujours au moins un individu). Nous devons aussi nous assurer que la taille totale de la métapopulation ne soit pas trop importante afin d'éviter qu'une mutation ne soit apparue avant l'échantillonnage et qu'elle n'ait donné lieu à plusieurs mutants disséminés dans plusieurs échantillons. La probabilité qu'une telle situation survienne, dans l'approximation d'un inoculum supérieur à 10 individus nous est donnée par l'équation IV-2.

$$P_{ms}(i_0, n, \mu) = (1 - e^{-\frac{i_0 \mu n}{2}}) \sum_{k=1}^{\lfloor \ln 2(i_0 n) \rfloor} (1 - \frac{1}{n^k}) / 2^k$$

Equation IV-2 : Probabilité P_{ms} qu'une métapopulation, constituée de n sous-populations de taille initiale i_0 issues d'une même population originelle, présente au moins deux sous-populations contenant au moins un individu mutant montrant la même mutation (de taux de mutation μ) apparue avant la compartimentalisation de la population originelle. Cette équation est valable sous l'hypothèse que $i_0 > 10$, ce qui nous permet de faire l'approximation que la recherche d'un mutant dans une sous-population est un tirage sans remise. Pour $i_0 \mu n \ll 1$ et $n \gg 1$ (ce qui est le cas de figure souhaité), $P_{ms} \sim i_0 \mu n / 2$.

Dans le cas de 1000 sous-populations bactériennes, cette probabilité est inférieure à 5% pour un inoculum de 100 individus, en considérant un taux de mutation inférieur à 10^{-6} . Nous déciderons donc de travailler avec des inocula initiaux de 100 bactéries par goutte, ce qui nous assure des échantillons homogènes (écart-type de 10%) pour un faible risque de biais causé par une diversité initiale.

Afin de réaliser avec notre système millifluidique ce type de test pour étudier la réponse à un stress antibiotique, le plus simple serait d'imaginer injecter la quantité voulue de nourriture et d'antibiotique dans chaque goutte après incubation. Seulement les volumes entrant en jeu sont trop importants pour effectuer un tel transfert à l'aide des technologies existantes. Nous avons donc décidé de contrôler et de mettre à profit une des limitations du dispositif millifluidique : la coalescence des gouttes causée par la diminution de la taille des séparateurs d'air.

IV.2 Contrôle de la coalescence

Pour pouvoir stresser et nourrir suffisamment et significativement une population afin d'observer une variation dans le signal de fluorescence, nous devrions ajouter à une culture existante de concentration bactérienne connue, un volume important de milieu de culture contenant l'antibiotique dissout. Nous voudrions par exemple doubler le volume de cette culture en y introduisant le milieu frais et l'antibiotique. En millifluidique, ce procédé d'addition d'un grand volume peut être réalisé par fusion entre deux gouttes car le procédé standard d'addition de composé dans une goutte ne concerne que des volumes de l'ordre du nanolitre [36]. Nous pourrions ainsi générer un train contenant des gouttes de milieu pauvre calibré avec un faible inoculum en bactéries et des gouttes contenant un milieu riche calibré et de la gentamicine. Une fois les cultures des premières gouttes arrivées en phase de saturation, nous voudrions pouvoir la fusionner avec une goutte contenant du milieu riche et l'antibiotique.

Cette fusion ne peut avoir lieu que si les gouttes sont voisines et si la bulle d'air qui les sépare a disparu. Cette bulle peut disparaître naturellement au cours du temps pendant l'incubation, comme nous l'avons vu dans le chapitre II, mais ce processus est long et peu reproductible. En revanche, si nous augmentons la pression globale appliquée au train de gouttes, les bulles vont voir leur volume diminuer (selon la loi des gaz parfaits) et vont plus facilement se dissoudre dans l'huile fluorée. L'augmentation de la pression peut donc favoriser en priorité la coalescence de gouttes séparées par de petites bulles. Nous souhaitons alors adopter la stratégie suivante : nous voulons déclencher la fusion de gouttes par paires quand les gouttes de cultures sont toutes arrivées à saturation, nous devons donc nous assurer qu'à cet instant-là, le volume des bulles en question soit aussi petit que possible, sans toutefois qu'il y ait déjà eu de coalescence entre gouttes, et que les bulles séparant les gouttes que nous ne souhaitons pas fusionner en augmentant la pression, soient suffisamment grandes pour que cela ne se produise pas.

IV.2.A Diminution continue de la taille des séparateurs

Nous observons que la taille des séparateurs diminue au cours du temps pendant l'incubation, et notre premier travail est donc d'évaluer la diminution de ces séparateurs au cours du temps pour fixer les volumes initiaux des bulles. Les facteurs influençant la vitesse de cette diminution sont :

- La température d'incubation
- La pression imposée au train de gouttes
- La position du séparateur dans le train (en relation avec la pression moyenne subie par le séparateur)
- La respiration des communautés de micro-organismes

Nous avons ainsi étudié la variation de volume des séparateurs pour différentes conditions après un temps d'incubation suffisant pour que nous puissions en mesurer les variations. Nous représentons ces variations (figure IV-6) en comparant la taille des séparateurs mesurée sous 200mbar initialement et après 22h d'incubation à 37°C. Nous observons une importance nette de la pression et de la respiration des bactéries. En particulier, nous observons une diminution très variable des bulles encadrées par des gouttes contenant des cultures de bactéries.

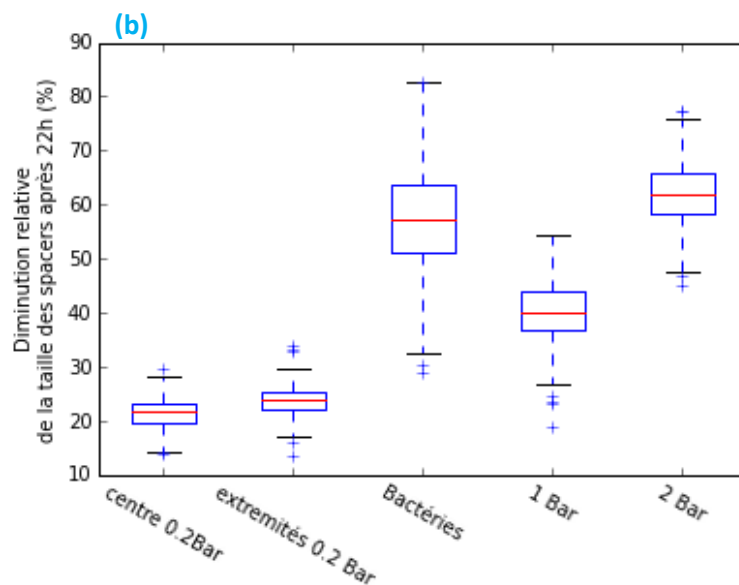
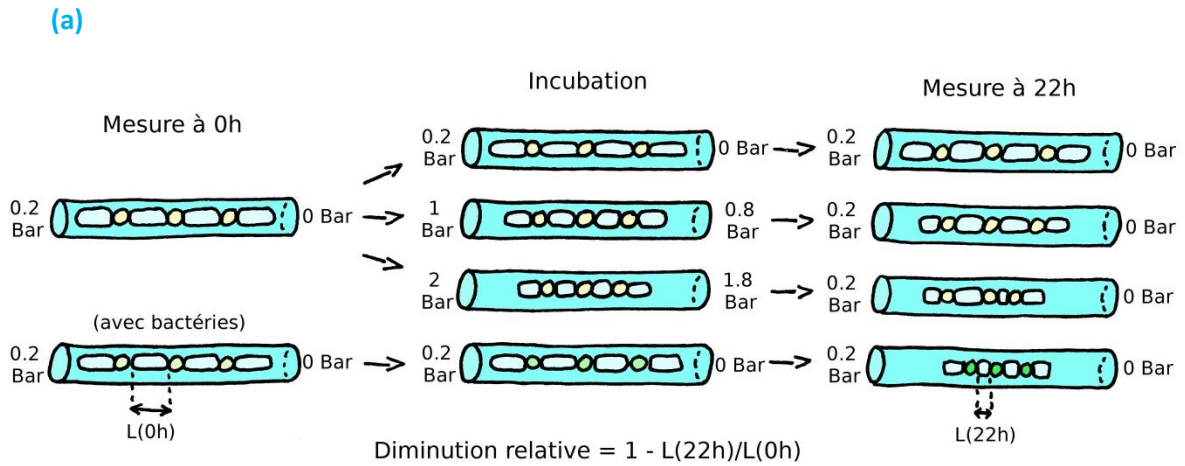


Figure IV-6: (a) Principe de la mesure de la diminution relative de la taille des séparateurs. Nous mesurons la taille initiale de toutes les bulles (longueur initiale 10mm en moyenne, mesurée sur photographie), nous leur imposons une condition d'incubation particulière pendant 22h, puis nous évaluons à nouveau leur taille dans les mêmes conditions de pression qu'au départ. (b) Diminution du volume des séparateurs (mesuré sous 0.2 bar) de trains de 1000 gouttes après 22h d'incubation à 37°C en fonction de la pression appliquée (0.2, 1 ou 2 bar, pour une différence de pression constante de 0.2 bar), de leur position dans le train (50% au centre ou les 50% aux extrémités), et encadrés par des gouttes contenant des bactéries *E. coli Aflu* sous 0.2 bar (concentration initiale de 100 bactéries par goutte). Une seule expérience a été réalisée dans chaque cas. Nous voyons ici que la diminution de bulles d'air est peu importante et assez reproductible pour les basses pressions, en revanche la présence de bactéries diminue considérablement la taille des séparateurs, cet impact est du même ordre qu'une pression moyenne appliquée qui serait de l'ordre de 2 bar, mais les résultats en sont beaucoup plus dispersés. Nous avons donc intérêt de fusionner nos gouttes dès leur saturation afin d'éviter que les cultures de bactérie n'affectent pas le volume des séparateurs.

Ces résultats nous poussent à ne pas utiliser la pression comme vecteur de coalescence durant l'incubation car la diminution des séparateurs est très variable. Nous incuberons donc notre train de gouttes sous faible pression (200mbar) et déclencherons la fusion dès que les cultures seront arrivées à saturation pour qu'elles n'affectent pas la taille des séparateurs.

IV.2.B Déclenchement de la fusion

Nous observons que la coalescence entre deux gouttes consécutives apparaît bien avant que le volume des séparateurs ne soit nul. En effet, une fois que la taille des séparateurs passe en dessous d'un volume critique, dans le cas d'un train compact, le séparateur n'est plus capable de demeurer entre deux gouttes, il va inverser sa position avec l'une des gouttes et coalescer (figure IV-7).

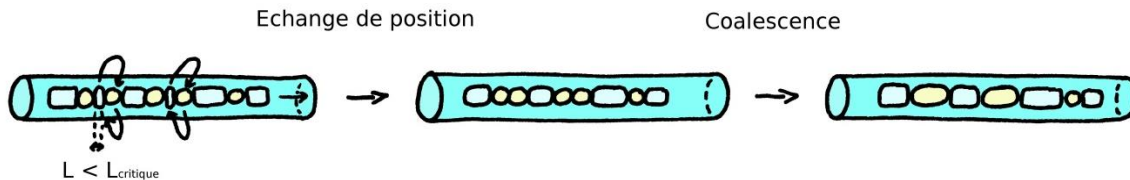


Figure IV-7: Si un séparateur présente une longueur inférieure à une longueur critique (par exemple sous l'effet de la pression ou par vieillissement), longueur critique de l'ordre de grandeur du rayon du tuyau, alors le-dit séparateur peut échanger sa position avec la goutte en aval, coalescer avec le séparateur devant lui, dans le cas d'un train compact. Deux gouttes se trouvent ainsi non séparées par un séparateur et vont pouvoir coalescer (les bulles fusionneront de même).

En mettant à profit ces observations, nous pouvons contrôler la coalescence des gouttes en choisissant le volume initial de chaque séparateur et la quantité initiale d'huile contenue entre deux gouttes. Notre objectif est qu'aucune coalescence ne survienne jusqu'à la fin de la croissance des bioréacteurs, puis que nous augmentions la pression afin de faire passer le volume des séparateurs choisis en dessous du volume critique et de déstabiliser le train en augmentant la vitesse moyenne de celui-ci. Nous arrivons ainsi à provoquer la coalescence de 95% de nos paires de gouttes sur un intervalle de temps de 5 minutes pour des gouttes de 10 μ L et des séparateurs de taille initiale à 200mbar de 5 μ L et 20 μ L. Quelques paires de gouttes, identifiables, auront coalescé avant le déclenchement de la coalescence généralisée ou ne coalesceront pas.

IV.2.C Concentration des gouttes fusionnées

Nous calibrons le volume des gouttes à fusionner pour qu'elles fassent un volume de 10 μ L, mais ces gouttes ne peuvent pas être parfaitement mono-disperses (soit V_c et V_s les volumes des gouttes de culture et de stress). Nous connaissons parfaitement la concentration en milieu de culture et en antibiotique pour chacune de ces gouttes (soit C_c et C_s les concentrations en ces espèces des gouttes de culture et de stress). La concentration finale en une espèce chimique dans la goutte issue de la fusion des deux gouttes nous est donnée par $C_f = (C_c V_c + C_s V_s) / (V_c + V_s)$, l'incertitude sur les volumes V_c et V_s va donc créer une incertitude sur la concentration C_f .

Les gouttes obtenues après coalescence ne seront donc pas homogènes en concentration (nourriture, antibiotique) et présenteront des fluctuations sur la taille de l'inoculum. Afin d'évaluer la fluctuation des concentrations dans les gouttes fusionnées, nous avons réalisé un train composé de 1000 gouttes fluorescentes et non fluorescentes, les avons coalescées par paires, puis avons mesuré le signal de fluorescence résultant (figure IV-8). Les gouttes obtenues présentent des concentrations en FS assez disparates, avec un écart-type de presque 10%, ce qui est nettement supérieur au bruit de mesure (autour de 2%).

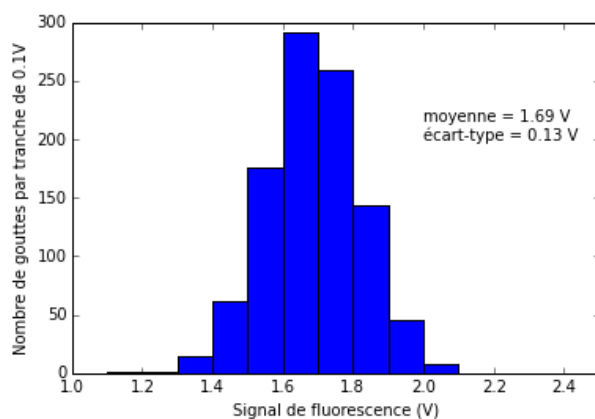


Figure IV-8 : Distribution du signal de fluorescence de gouttes issues de la coalescence d'une goutte d'eau et d'une goutte de solution de FS (signal des gouttes non fusionnées de 3.34V en moyenne). Nous évaluons ainsi une incertitude de l'ordre de 10% sur la concentration en antibiotique dans les gouttes fusionnées.

Nous devons prendre en compte cette distribution des concentrations en espèces lors de l'analyse des comportements en réponse à un stress. Par exemple, en appliquant un stress légèrement au-dessus du MIC (3 mg/L), nous pouvons nous attendre à ce que quelques rares échantillons fusionnés présentent une concentration de 2mg/L, et donc que nous mesurons des croissances bactériennes pour un stress théorique au-dessus du MIC.

Enfin, notre travail sur les contaminations nous montre que le nombre d'individus transférés entre gouttes avant la coalescence est de l'ordre d'une dizaine, ce qui est suffisamment petit pour qu'il soit improbable qu'un mutant soit parmi eux et puisse croître dans une goutte contenant initialement l'antibiotique et du milieu. Nous pouvons donc réaliser nos expériences de mesure de la diversité de résistance à un antibiotique sans nous soucier des contaminations, du moins jusqu'à la fusion des paires de gouttes.

En revanche, si nous souhaitions utiliser cette méthode pour stresser des cultures qui sont en phase stationnaire prolongée, ses performances seraient moins bonnes. D'une part, l'efficacité du stress pourra diminuer si l'antibiotique se dégrade avec la température. D'autre part, la probabilité qu'un individu résistant envahisse une goutte stressante est beaucoup plus importante. Enfin, la prolongation de la culture des bactéries en goutte, va diminuer la taille des séparateurs de manière très variable et il sera difficile de s'assurer du contrôle de la fusion des paires de gouttes au bon moment.

IV.3 Expériences et résultats

IV.3.A Protocole

Nous avons donc combiné les deux protocoles, coalescence et fluctuation, pour nous permettre d'évaluer la distribution des résistances à un antibiotique. Nous avons choisi d'étudier en particulier la fluctuation de la résistance de la souche *E. coli* Δ *flh* à la gentamicine. Nous formons à température ambiante 1140 gouttes de 10 μ L inoculées avec une moyenne de 100 bactéries/goutte dans du milieu M9 (enrichi) dilué de manière à ce que la biomasse finale fasse 25% de la biomasse finale attendue, pour du milieu M9 standard (soit $2.5 \cdot 10^6$ bactéries/goutte). Chacune de ces gouttes est conjuguée à une goutte de 10 μ L de milieu M9 enrichi concentré (afin que la concentration moyenne des paires de gouttes après coalescence soit celle du milieu M9 enrichi standard) pouvant contenir de la gentamicine à une concentration deux fois supérieure au stress voulu. Le train est encadré par 4 plugs d'eau mQ à ses extrémités.

Le train est incubé à 37°C sous une différence de pression de 200 mbar (pression aval de 0mbar) et le signal de fluorescence des gouttes est ainsi mesuré à une fréquence moyenne de 0.5 goutte/s. Une fois toutes les gouttes initialement inoculées arrivées à saturation bactérienne (à partir de 6h), nous augmentons graduellement la pression jusqu'à une pression aval de 5 bar pour une différence de pression de 400 mbar en 5 minutes, ce qui provoque la coalescence par paire de 95% des gouttes, puis nous réduisons graduellement la pression sur 5 minutes pour revenir dans les conditions initiales d'incubation (figure IV-9) . Le signal des gouttes n'est pas mesurable durant cette opération de coalescence. Nous mesurons ensuite le signal de fluorescence des gouttes coalescées jusqu'à 22h.

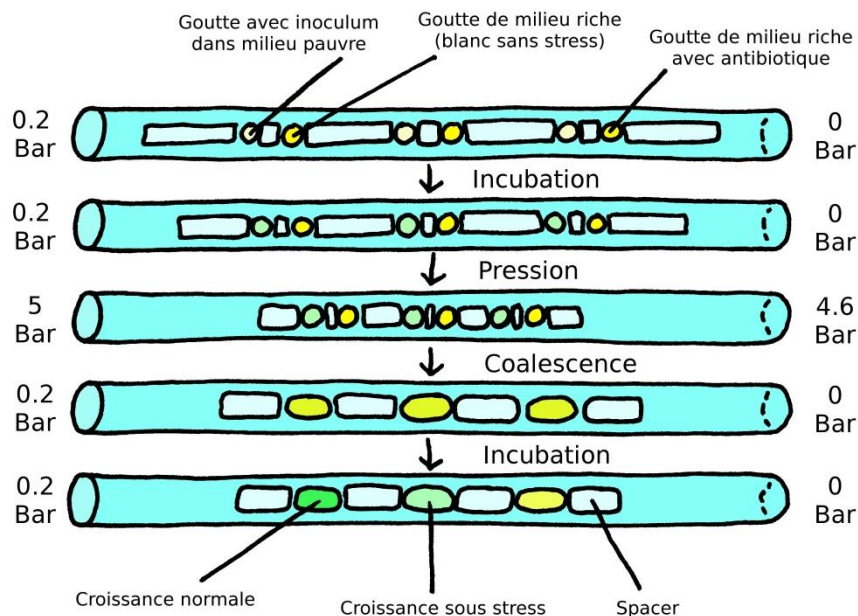


Figure IV-9 : Principe de la coalescence contrôlée en microfluidique pour mesurer la fluctuation des réponses d'une NEM à un stress antibiotique.

IV.3.B Fluctuation des croissances

Des 1140 paires de gouttes initialement formées, nous ne retiendrons pour analyse que les 1000 paires ayant effectivement fusionné durant l'opération de coalescence, dont le signal de croissance avant coalescence ne présentait pas d'anomalie (signal très fluctuant, signal initial élevé, croissance hors norme), et se trouvant le plus au centre possible du train de gouttes (l'oxygénation des gouttes modifie la croissance des populations situées aux extrémités du train). Nous avons réalisé cette expérience pour 8 concentrations de stress en gentamicine (de 0 mg/L à 3.5 mg/L) et nous avons observé avec un intérêt particulier la distribution des biomasses finales des populations (c'est-à-dire le signal du plateau final de la courbe de croissance). Nous nous proposons tout d'abord de comparer sur la figure IV-10 les courbes de croissances obtenues dans ce cas sans antibiotique et avec 2.0mg/L de gentamicine avec leurs équivalents obtenus auparavant sans fusion contrôlée.

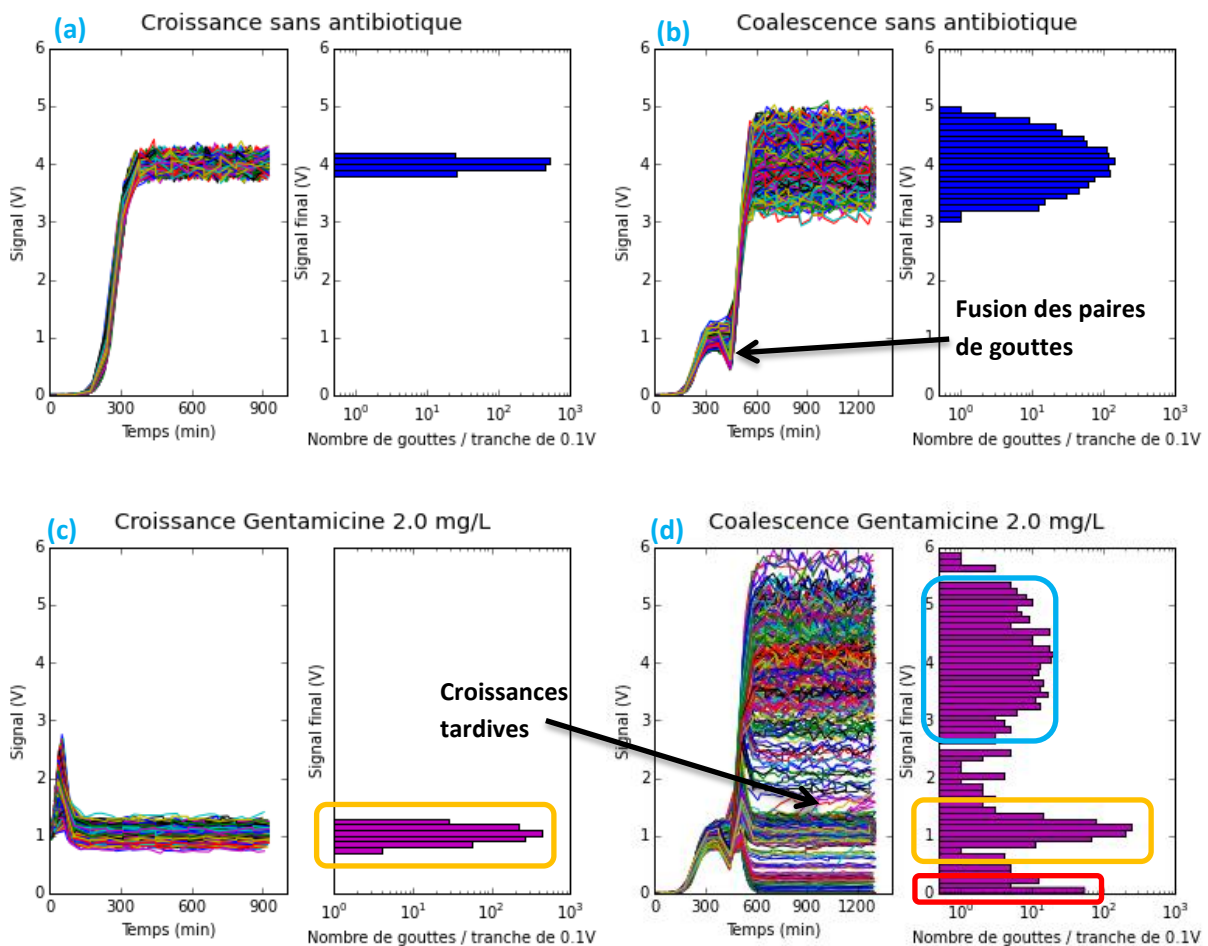
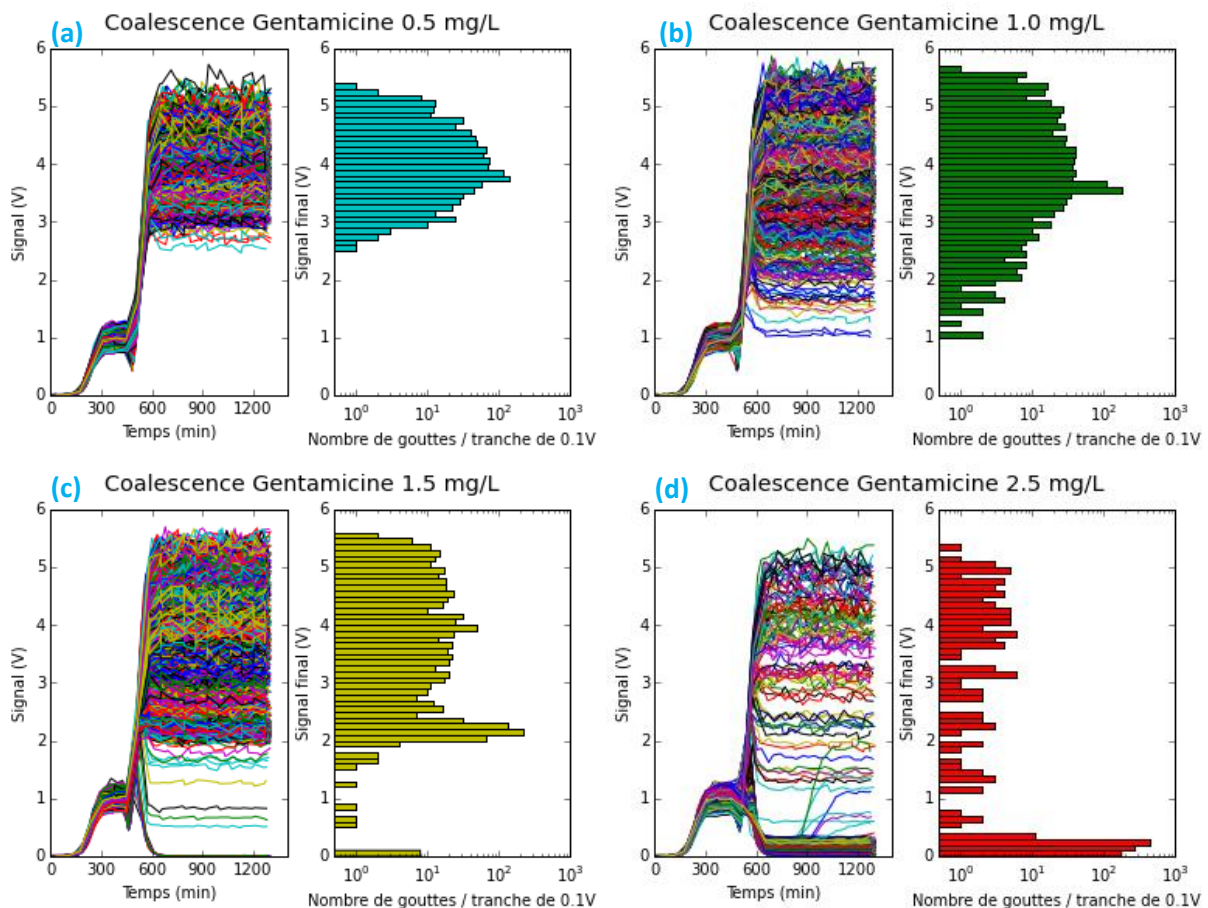


Figure IV-10 : (a&c) Croissance à partir de gouttes déjà formées, la figure du haut est la figure IV-2 (inoculum de 10^2 bactéries) et la figure du bas est celle de la figure IV-4a mise à l'échelle (inoculum de 10^6 bactéries). (b&d) Signal de fluorescence de 1000 gouttes incubées à 37°C en milieu M9 dilué à partir d'inoculum de 100 bactéries *E. coli Aflu* par goutte de $10\mu\text{L}$, fusion vers 400min pour obtenir des gouttes de $20\mu\text{L}$ de milieu M9 en présence de gentamicine à des concentrations de 0mg/L (en haut) et 2.0 mg/L (en bas). Nous observons une augmentation nette de l'écart-type du signal final entre (a) et (b), cette augmentation est cohérente avec l'incertitude sur la concentration en nourriture (voir IV.2.C). La distribution du signal final observé en (c) est retrouvée en (d) avec une valeur moyenne 10% plus élevée (réponses entourées en orange). Un deuxième type de réponse est observé, sa distribution est centrée sur 4V, comme dans le cas de populations non stressées à un antibiotique (voir (c)) mais d'écart-type plus important (réponses entourées en bleu) ; cette observation ne s'explique pas par

l'incertitude sur la concentration en nourriture. Nous observons aussi qu'une proportion non négligeable des populations sont éteintes (environ 5%, réponses entourées en rouge), cette observation, non plus, ne s'explique pas par l'incertitude sur la concentration en nourriture. Enfin, nous pouvons observer quelques croissances tardives commençant après que la population a atteint son plateau de saturation sur (d). Leur temps de retard à la croissance, par rapport au moment de la fusion des gouttes, n'est pas incohérent avec l'émergence d'un faible nombre d'individus au moment du stress, il peut donc s'agir de mutants.

Les différentes observations faites avec un stress de 2.0mg/L de gentamicine se retrouvent avec les autres concentrations imposées (figures IV-11). Toutes les courbes de croissance suivent une même tendance : une première croissance pré-stress (avant coalescence), une baisse significative du signal après coalescence suivie par une seconde croissance, qui semble indépendante du stress imposé, puis chaque signal tend vers une valeur limite fixe de fluorescence. Dans certains cas, nous pouvons remarquer une troisième phase de croissance apparaissant après avoir atteint cette valeur limite si celle-ci est faible devant le signal limite moyen attendu sans stress.



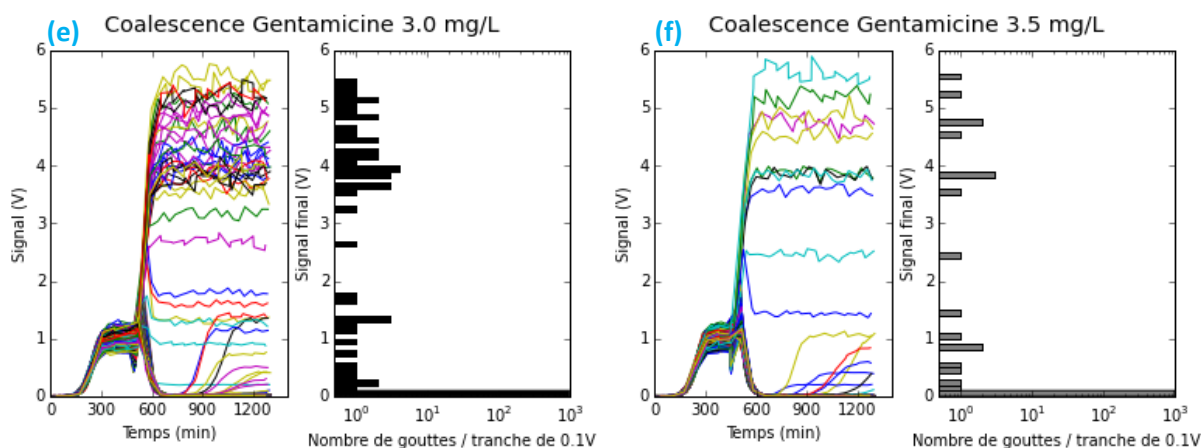


Figure IV-11 : Signal de fluorescence de 1000 gouttes incubées à 37°C en milieu M9 dilué à partir d'inoculum de 100 bactéries *E. coli Aflu* par goutte de 10µL, coalescence vers 400min pour obtenir des gouttes de 20µL de milieu M9 en présence de gentamicine à des concentrations de 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.0 et 3.5 mg/L après coalescence et incubation à 37°C. Distribution du signal final de fluorescence à 1200min. Sur toutes les courbes, nous observons une croissance homogène normale (croissance exponentielle et saturation) jusqu'à un signal d'environ 1V et environ 400min. A cet instant la coalescence des paires de gouttes est forcée et le signal des goutte diminue jusqu'à environ 0.5V (dilution par 2 des bactéries), les populations croissent alors de manière exponentielle avec le même taux de croissance que pour la première croissance, mais rapidement elles tendent vers une autre valeur de biomasse et qui peut être nulle. Pour les biomasses finales, nous pouvons observer une nouvelle phase de croissance correspondant probablement à l'émergence d'un mutant.

Cette méthode nous a permis effectivement de mesurer une modification de la distribution de la résistance à l'antibiotique. En particulier, nous observons plusieurs types de comportement (figure IV-10) que nous classons en fonction de leur biomasse finale. Nous observons un type de gouttes qui se comportent comme dans le cas sans coalescence : leur proportion varie moins, ainsi que leur écart-type, mais la moyenne de leur signal final diminue avec l'augmentation du stress antibiotique de la même manière (figure IV-12c). Chez le second type de gouttes, le signal final est relativement indépendant du stress antibiotique, seuls l'écart-type de leur distribution et leur proportion dans la population de gouttes augmente et diminue respectivement. Le troisième type de gouttes correspond aux populations éteintes dont le signal de fluorescence tend vers zéro, leur proportion augmente logiquement avec l'augmentation du stress antibiotique (figure IV-12d).

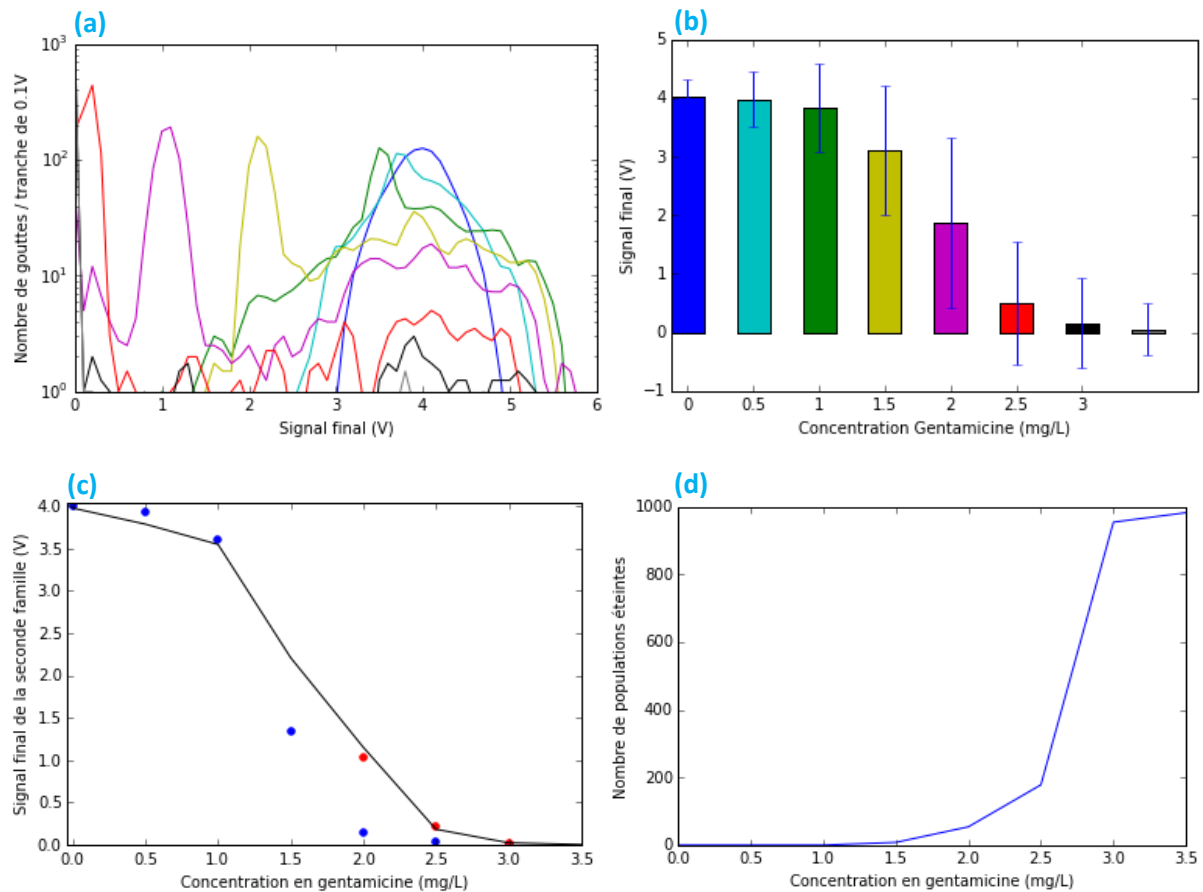


Figure IV-12 : (a) Distribution du signal de fluorescence à 1200min en fin de croissance en fonction de la concentration en gentamicine. Une première famille de population voit son signal final diminuer avec la concentration en gentamicine de 4V à 0V, une seconde demeure centrée sur un signal de 4V, tandis qu'une troisième famille centrée sur 0V prend de plus en plus d'ampleur avec l'augmentation de la concentration en gentamicine. (b) Variation du signal final moyen avec la concentration en gentamicine. (c) Signal final de fluorescence moyen du premier type de réponse en fonction de la concentration en gentamicine (courbe noire), variations identiques obtenues sans coalescence sur toutes les gouttes à partir d'un inoculum de 10^2 bactéries/goutte (voir figure IV-2) (points bleus) et variations identiques obtenues sans coalescence sur toutes les gouttes à partir d'un inoculum de 10^6 bactéries/goutte (voir figure IV-4) (points rouge). (d) Nombre de populations du troisième type de réponse (mort de la population) en fonction de la concentration en gentamicine.

IV.3.C Evaluation des mutations

A ces trois types de réponses au stress, nous pouvons ajouter une quatrième catégorie observée qui est commune aux deux derniers cas : pour les populations dont le signal final est plus faible que le signal attendu sans stress, nous pouvons parfois observer une troisième phase de croissance ayant lieu plusieurs heures après le début du plateau de fin de seconde croissance (celle faisant suite à la coalescence). Ces croissances présentent un taux de croissance variable, mais inférieur au taux de croissance des autres populations. Leur signal final est lui aussi variable. Ces croissances sont cohérentes avec l'émergence d'une sous-population résistante à l'antibiotique, un mutant est donc probablement apparu lors des deux phases précédentes de croissance. Il n'est pas toujours évident de distinguer les populations présentant une troisième phase de croissance des autres populations, en particulier pour celles dont le signal correspondant au plateau de fin de seconde croissance est élevé. Nous avons néanmoins énuméré ces populations « mutantes » pour chaque stress antibiotique (figure IV-13a). Les faibles concentrations en antibiotique ne permettent pas de suffisamment discriminer les non mutants pour pouvoir les détecter. Le

nombre de mutations sans stress antibiotique nous informe sur la fiabilité de notre mesure : cette mesure évalue la ligne de base de notre compte.

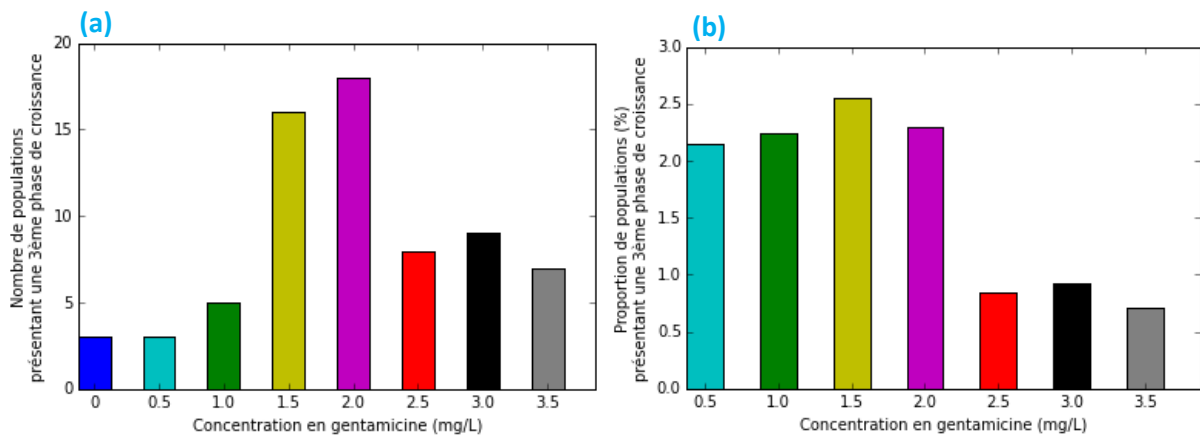


Figure IV-13 : (a) Nombre de populations présentant une troisième phase de croissance en fonction de la concentration en gentamicine. (b) proportion de ces g populations rapportée sur le nombre de population où une telle troisième croissance est détectable en fonction de la concentration en gentamicine.

Nous observons ainsi deux ordres de grandeur de quantité de mutations bénéficiaires aux bactéries avec une frontière comprise entre 2.0 et 2.5 mg/L. Nous avons ensuite normalisé ce nombre de populations mutantes par le nombre de populations où nous aurions pu détecter une troisième phase de croissance (figure IV-13b), ceci corrige en particulier la diminution apparente de mutation pour les faibles concentrations en antibiotique. Nous souhaiterions déterminer la probabilité d'apparition de mutation correspondant à un stress donné. Pour cela, nous déterminons la biomasse maximale durant la seconde phase de croissance de chacune des populations mutantes, nous en estimons le nombre de divisions correspondant et nous pouvons ainsi déterminer la probabilité d'apparition d'une mutation par division (figure IV-14). Nous déterminons ainsi que le nombre de mutations bénéficiaires en réponse au stress antibiotique est du même ordre de grandeur quelle que soit la concentration en gentamicine, et présente un maximum autour de la concentration maximale non inhibitrice.

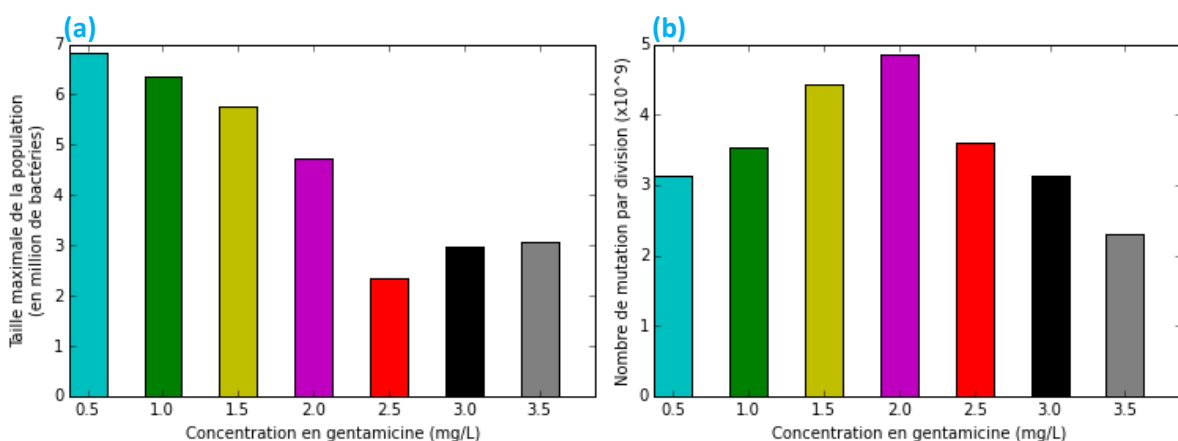


Figure IV-14 : (a) Evaluation de la taille moyenne maximale des populations présentant une troisième phase de croissance, avant cette dernière, en fonction de la concentration en gentamicine. (b) Evaluation du nombre moyen de mutations bénéficiaires en réponse au stress antibiotique (gentamicine), génétiques par division en fonction du stress appliqué, sous l'hypothèse que les troisièmes croissances observées correspondent à la fixation d'une colonie mutante dans la niche libérée. Ceci est un estimateur du taux de mutation μ avec une erreur de l'ordre de 40%.

Nous notons néanmoins que l'ordre de grandeur mesuré, du nombre de mutations par division, est très inférieur à l'ordre de grandeur attendu (10^{-6} /division). Il est possible qu'un grand nombre de mutations échappent à notre méthode de détection, il est aussi possible qu'une mutation donnée ne soit pas bénéfique dans 100% des cas : son activité peut dépendre de l'état métabolique de la bactérie au moment du stress, ou plusieurs mutations sont nécessaires pour activer ou améliorer un mécanisme de résistance. D'un point de vue évolutif, cette mesure présente néanmoins un intérêt certain, car elle évalue la probabilité pour qu'un mutant puisse se fixer au sein d'une métapopulation : l'individu se développant le plus vite après libération de la niche écologique et présentant la biomasse finale la plus importante est bien avantage.

IV.3.D Limitation de la méthode

Notre méthode d'évaluation de la diversité au sein d'une métapopulation bactérienne présente quelques limites. En dehors de la difficulté de mesurer précisément la réponse diversifiée des populations, nous notons les existences d'une incertitude sur le stress imposé et d'un biais causé par les échanges entre gouttes.

La forte disparité de ces concentrations pourrait expliquer le plus grand bruit des réponses des populations stressées avec coalescence et nous laisse penser que certaines populations réussissent à croître dans le cas des concentrations supérieures au MIC car certaines gouttes présentent statistiquement une plus faible concentration en antibiotique. En réalité, l'incertitude sur les concentrations n'est pas suffisante pour expliquer la distribution observée, elle va élargir le pic de réponse attendue de manière asymétrique. D'après l'évaluation de la biomasse en fonction de la concentration en gentamicine et de l'inoculum effectué au début de ce chapitre, nous devrions observer un élargissement du pic de réponse vers les valeurs inférieures de signal de fluorescence lorsque le stress est supérieur à 2.0 mg/L. Cette valeur est à peu de chose près la concentration pour laquelle la courbe donnant la biomasse finale en fonction de la concentration en antibiotique s'infléchit, pour un inoculum de 10^6 bactéries/gouttes (voir la figure IV-4). De même nous devrions observer un élargissement du pic de réponse vers les valeurs supérieures pour un stress inférieur à 2.0mg/L. Non seulement ce phénomène n'est pas observé, mais la disparité des signaux finaux mesurés est sans comparaison avec celle attendue du fait de l'incertitude sur les concentrations.

Compte tenu de notre connaissance des échanges entre populations dans notre système millifluidique, nous pouvons aussi nous demander si ces derniers peuvent avoir biaisé nos résultats. Ces échanges sont trop faibles pour que les populations aient subi un stress suffisant avant coalescence, et ne permettent pas non plus d'affecter significativement la distribution des réponses. Néanmoins, il y a lieu de se demander si les populations présentant une troisième croissance n'auraient pas été contaminées par d'autres populations résistantes. Si une telle possibilité semble très probable dans le cas d'une métapopulation présentant une biomasse globale très importante, cela semble peu probable dans le cas contraire. Or, le nombre de telles populations varie peu avec le stress et donc avec la taille de la métapopulation, c'est pourquoi ces échanges ne nous semblent pas biaiser nos résultats. De plus, nous avons observé que la probabilité de succès pour une colonie de résister à un stress augmente avec sa taille, une contamination correspondant à l'arrivée d'une bactérie résistante seule a donc très peu de chance de former une nouvelle population, à moins de présenter une résistance particulière à l'antibiotique, tout en étant très abondant, ce qui a peu de chances de se produire.

Nous avons donc voulu chercher une explication à la forte diversification des réponses observées. Le stress physique imposé aux gouttes pour les faire fusionner (une pression de 5 bar pendant 10 minutes) n'affecterait-il pas la résistance des bactéries à la gentamicine ? Nous avons donc cultivé en tube à essai deux échantillons de *E. coli Δflu*, et avons appliqué une pression de 5 bar sous agitation à l'un d'entre eux. Nous avons ensuite mesuré le MIC de ces échantillons pour la gentamicine sur plaque 96 puits (figure IV-15). Nous avons observé une forme de diversification de la réponse des bactéries à l'antibiotique. Il est clair que la pression impacte le métabolisme des bactéries (à commencer par les bactéries extrémophiles), mais c'est la première fois que nous constatons ce type de comportement face à la pression. Il est donc possible que la diversité que nous avons observée avec notre protocole de fusion en gouttes soit biaisée par la pression que nous avons imposée.

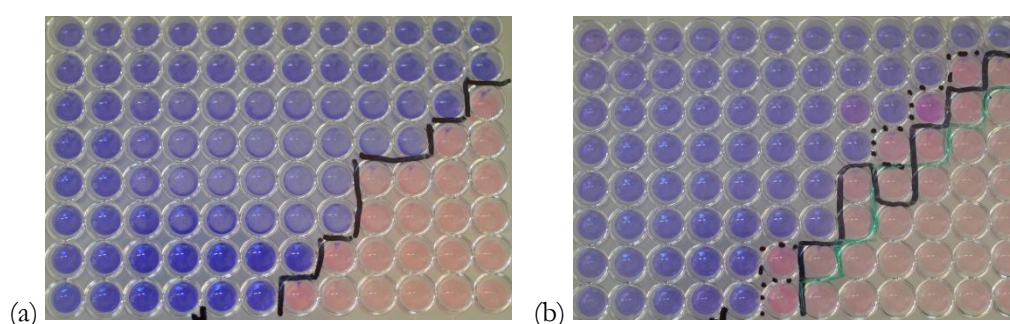


Figure IV-15 : Mesure de MIC de deux échantillons d'une culture de *E. coli Δflu*, l'une ayant été exposée à 5bar de pression. La mesure du MIC est une méthode par dilution successive sur plaque : les puits des diagonales sont à la même concentration et la concentration gentamicine est divisée par 2 à chaque fois que l'on s'éloigne de 1 puits du puits A1 (en haut à gauche). Les cultures ont été mélangées avec de la résazurine qui reste bleue en cas de non croissance biologique. Les photographies ont été prises 48h après préparation des plaques. Les traits noirs continus représentent la limite entre croissance/non croissance à 24h. Les traits noirs discontinus encadrent les puits présentant une croissance détectée après 24h. Le trait vert sur (b) est identique au trait noir sur (a) pour les comparer. (a) Mesure de MIC sur des bactéries cultivées normalement. (b) Mesure de MIC sur des bactéries ayant subi 10 min de pression à 5 bar. Nous observons que le MIC est augmenté, presque doublé, dans le second cas et que les réponses des bactéries sont moins tranchées que pour la plaque (a). Une diversification apportant une certaine résistance est donc observée.

IV.4 Conclusion

Malgré cette difficulté à quantifier la probabilité de mutation bénéficiaire en réponse à un stress antibiotique, ces résultats confirment la validité de notre méthode pour faire apparaître la diversité acquise par une communauté de micro-organismes, mais montrent aussi les comportements de résistance de nos souches aux antibiotiques testés. En déterminant la proportion de populations ne survivant pas au stress, nous pouvons estimer le nombre de mutants apparus dans la métapopulation et ainsi en déduire le taux de « mutation » d'un couple donné bactérie-antibiotique.

Nous avons donc pu établir une méthode permettant de sonder la diversité acquise par une population de bactéries sur un faible nombre de générations. Ce protocole demeure en pratique compliqué à réaliser et peut difficilement être utilisé dans nos expériences de sélection artificielle sur le long terme, d'autant que cette technique présente quelques limitations. Les nombreuses difficultés que nous rencontrons pour effectuer notre sélection avec notre instrument tient à la manière dont nous inoculons un nouveau train de gouttes à partir du précédent, méthode longue et causant de forts échanges entre gouttes et avec le milieu extérieur à la métapopulation.

La limitation principale, liée au bruit sur le stress appliqué, pourrait être relativisée en évaluant goutte à goutte leurs volumes et donc en calculant le stress appliqué. Si la complexification de l'analyse des données permet de mieux interpréter nos résultats, le stress par coalescence de gouttes générées initialement ne permet pas d'imposer un stress unique et d'effectuer robustement une sélection sur les gouttes. L'élaboration d'un nouveau module technologique permettant de résoudre certains de ces problèmes et d'automatiser le processus de sélection artificielle, fera l'objet du dernier chapitre. Ce module permettra de réaliser ces expériences de fluctuation de manière plus robuste qu'en exploitant la coalescence des gouttes, et permettra de tester a posteriori la résistance effective des populations afin de déterminer si leur croissance relève de la mutation, de l'organisation de la population ou du simple artefact.

Chapitre V

Une Nouvelle approche technologique pour l'évolution dirigée

V Une Nouvelle approche technologique pour l'évolution dirigée

Notre étude de l'évaluation de la diversification nous a confirmé que la taille de nos cultures serait bien adaptée pour faire de la sélection artificielle. Il est clair que la sélection des communautés de micro-organismes est la bonne stratégie pour diriger l'évolution de ces populations. Il n'existe pourtant pas d'outil automatisé qui permette aujourd'hui de le faire, cela relève de défis technologiques très importants. Depuis plus de dix ans, le laboratoire fait progresser sa technologie millifluidique pour lui permettre de faire évoluer des organismes et nous nous en approchons peu à peu, mais, comme nous l'avons vu, nous atteignons les limites de ses performances et il est peut-être temps d'être disruptif.

Le dispositif millifluidique exploité jusqu'à maintenant n'est pas optimal pour cultiver un grand nombre de populations en parallèles en les transférant en séries. Sa principale limitation tient au transfert (et à la sélection) des cultures d'un train de gouttes vers un autre. En effet, le transfert consiste à sortir l'ensemble des gouttes de la machine en les triant sur une plaque multi-puits, à diluer ces cultures et à former un nouveau train à partir des cultures diluées que nous avons sélectionnées, ceci manuellement. Pour un train de 1000 gouttes, ce transfert dure 3h et cette durée sera d'autant plus longue que le train contiendra un nombre important de réacteurs. Enfin, ces opérations sont toutes difficiles à automatiser.

Ce laps de temps est problématique car nous ne maîtrisons pas ce qu'il advient des populations pendant cette durée : les conditions de température, d'évaporation, de croissance, d'exposition à la lumière ainsi que les échanges biologiques ou chimiques, ne sont ni parfaitement contrôlés ni mesurables avec précision pour chaque population. Une pression aléatoire de sélection va donc biaiser le comportement des populations à chaque transfert. Le risque de contamination biologique provenant de l'extérieur est lui aussi critique car un seul individu extérieur peut modifier l'issue de l'évolution de la métapopulation.

Enfin, si nous souhaitons faire évoluer rapidement une métapopulation, nous avons intérêt à maintenir au maximum sa croissance en phase exponentielle. Or, nous souhaitons aussi maintenir une grande taille de bottle necks, ce qui implique un faible facteur de dilution lors du transfert et donc un faible nombre de générations en phase exponentielle. Le temps séparant deux transferts devrait être de l'ordre de ce nombre de générations multiplié par le temps de division. Par exemple, dans le cas d'une dilution par 1000 (ce qui est une dilution assez forte, puisque le bottle neck correspondant pour des gouttes de 10 μ L serait de 10⁴ bactéries), le temps d'incubation pour que les cultures soient à saturation serait de moins de 4h, dans le cas d'une dilution par 10 (plus doux, avec un bottle neck de 10⁶ bactéries), l'incubation durerait un peu plus d'une heure, et déjà un nouveau transfert devrait être effectué. La durée du transfert est donc une sérieuse limite dans le maintien des populations en phase de croissance exponentielle.

La durée du transfert tient à une approche trop globale que nous avons de la métapopulation : nous sortons toutes les gouttes de l'instrument, puis nous trions toutes les gouttes, nous diluons toutes les gouttes, nous formons toutes les gouttes du nouveau train, et enfin seulement l'incubation de toutes les gouttes est redémarrée. Chaque étape est appliquée à toutes les gouttes, en somme chaque population doit attendre que toutes les autres aient été reproduites pour pouvoir être incubée, ce qui n'est ni optimal ni naturel. L'échelle à laquelle nous cultivons nos communautés est définitivement la bonne pour les sélectionner, mais une rupture technologique est nécessaire. Il faudrait donc aborder la question d'une manière différente. Du point de vue d'une population, le transfert le plus efficace et le plus simple serait de former une nouvelle goutte de milieu, sélectionner un bioréacteur, lui prélever un volume correspondant au bottle neck voulu et l'injecter dans la nouvelle goutte ; cette opération serait répétée jusqu'à ce qu'un nouveau train de gouttes soit formé. C'est en voulant répondre à cette problématique que nous avons finalement abouti à une solution technologique adaptée.

Ce dernier chapitre présente une méthode de préparation d'échantillons biologiques ou chimiques en gouttes à partir d'autres échantillons en goutte préexistants, et qui est particulièrement adapté à la culture de communautés de bactéries. Le chemin a été long avant d'aboutir à cette solution complète et nous n'en détaillerons que l'aboutissement fructueux, mais qui nous met encore face à de nombreux défis technologiques. Nous introduirons cette méthode sous l'angle particulier de l'évolution dirigée durable de métapopulations en millifluidique. Si nous n'avons pas pu finaliser une expérience de sélection artificielle sur une longue durée pour mener à l'évolution d'une population, nous avons néanmoins abouti à la conception d'un instrument complet, et réalisé avec Ankur Chaurasia, post-doctorant depuis fin 2016 sur ce projet.

Dans un premier temps, nous présenterons le module-cœur de cette technologie. Nous l'intégrerons ensuite dans un instrument complet permettant de cultiver des communautés de bactéries. Enfin nous proposerons quelques modes opératoires utilisant cette technologie.

V.1 Module de transfert

Notre solution technologique consiste à manipuler au moins deux trains de gouttes compartimentés dans des tuyaux différents, et à transférer une gouttelette ponctionnée à une goutte à l'aide d'un dispositif, dit « module de transfert », vers une autre goutte avec laquelle elle fusionnera.

Notre méthode permet de transférer un échantillon de n'importe quelle goutte choisie d'un train de gouttes vers n'importe quelle autre goutte choisie, elle permet donc de réaliser précisément les deux opérations élémentaires de pipetage (prélever / ajouter) permettant toutes les opérations usuelles de manipulation d'échantillons en laboratoire. Chaque goutte pouvant être considérée comme un microréacteur, cette opération de transfert peut notamment jouer le rôle de préparation d'échantillons chimiques ou biologiques en diluant dans chaque goutte un mélange de différentes solutions mères constituant le train de gouttes originel [étapes d'initiation ou de conditionnement d'une expérience], ainsi que lier deux étapes d'une suite chimique (cinétique, suite réactionnelle) ou biologique (chemostat, sélection, conditions oscillantes) [étapes de transmission].

Plusieurs types de modules permettant d'effectuer un transfert entre gouttes ont été réalisés, nous nous limiterons à la présentation de celui dont nous avons le plus poussé le développement technologique.

V.1.A Transfert entre deux trains de gouttes

Deux trains de gouttes, telles que décrits dans le chapitre II, sont manipulés dans deux tuyaux distincts (rayon interne 1.1mm). Un canal (rayon interne 25 μ m) les connecte ces de manière à ce que la connexion de chaque tuyau au canal soit un type de jonction T (figure V-1), l'ensemble forme donc une jonction en « I ».

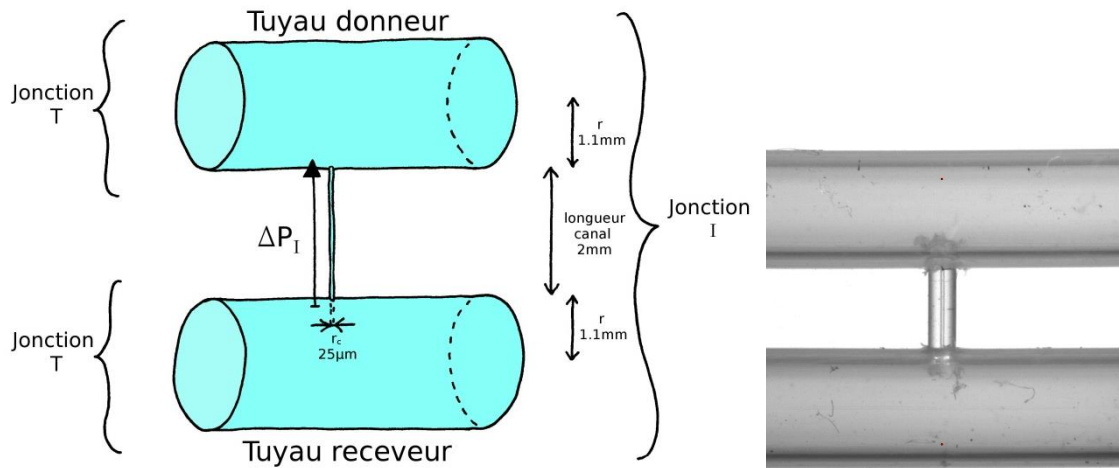


Figure V-1 : schéma d'une jonction I, le tuyau donneur a été arbitrairement choisi comme étant celui du haut, le gradient de pression va donc de bas en haut et le flux de phase continue dans la direction contraire. Photographie d'une jonction I constituée de deux tuyaux en PTFE, percés puis connectés par un capillaire fin en FEP (réalisation et photographie A. S. Chaurasia).

Si la pression hydrostatique est identique dans chaque train au niveau des jonctions T, aucun flux n'est possible entre les deux tuyaux. En augmentant la différence de pression entre les deux tuyaux au niveau de leur jonction T, ΔP_I , un flux de phase continue a lieu du tuyau qui présente la pression la plus élevée (dit tuyau « donneur ») vers l'autre tuyau (dit tuyau « receveur »). Si une goutte se trouve au niveau de la jonction T du tuyau donneur, et donc face au canal, le flux de phase continue pénétrant dans le canal va imposer une contrainte de cisaillement sur la surface de cette goutte et la déformer. La surface de la goutte va être déformée selon une compétition entre les forces de cisaillement et la tension de surface. Au-dessus des forces de cisaillements critiques causées par le flux de phase continue entre les deux tuyaux, la goutte pourra suffisamment être déformée pour être aspirée dans le canal.

La présence d'une goutte devant le canal modifie le flux de phase continue qui y pénètre. En effet, ce flux passe par le film de lubrification de la goutte. Le gradient de pression hydrostatique est donc lui aussi modifié car la goutte augmente la résistance au passage du flux de phase continue. L'entrée du canal va donc voir sa pression diminuer jusqu'à ce que le débit d'huile entre les deux extrémités du canal respecte les équations II-1. Si cette pression passe en dessous d'une pression critique, elle sera suffisante pour déformer suffisamment l'interface de la goutte pour lui donner un rayon de courbure inférieur ou égal au rayon du canal (figure V-2). La différence entre cette pression critique et la pression dans la goutte correspond donc à la pression capillaire d'une goutte dans le canal soit $2\gamma/r_c$ (35mbar dans notre cas). La différence de pression minimale entre les deux tuyaux pour initier un transfert de goutte, $\Delta P_{\text{transfert}}$, doit donc être au moins égale à environ $2\gamma/r_c$. La valeur exacte est $2\gamma(1/r_c - 1/r) \approx 2\gamma/r_c$ en négligeant le débit de phase continue passant par le film de lubrification séparant la paroi du tuyau de la goutte. Ce débit devient, en effet, de plus en plus faible au fur et à mesure que le film de lubrification s'amincit .

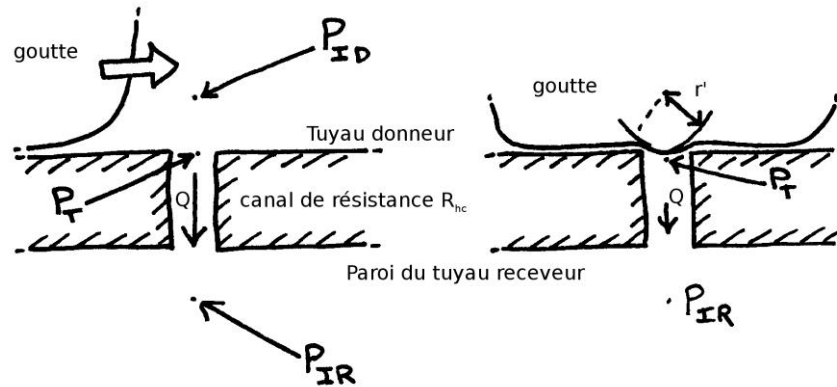


Figure V-2 : schéma d'une jonction I (r rayon des tuyau, r_c rayon du canal) avant le passage d'une goutte dans le tuyau donneur et au moment où une goutte donneuse se trouve face au canal. La pression P_{ID} est la pression au niveau de la jonction I dans le tuyau donneur, la pression P_{IR} est la pression au niveau de la jonction I dans le tuyau receveur (donc $P_{ID}-P_{IR} = \Delta P_I$), la pression P_T est la pression au niveau du T dans la phase continue à l'extrémité du canal du côté du tuyau donneur (donc initialement $P_T = P_{ID}$), R_{hc} est la résistance hydrolique du canal de transfert et Q le débit volumique au travers de ce canal. Avant l'arrivée de la goutte, nous avons donc $R_{hc} \cdot Q = \Delta P_I = P_{ID}-P_{IR} = P_T-P_{IR}$. Une fois la goutte arrivée, Q diminue, donc P_T va aussi diminuer et l'interface de la goutte va être localement déformée selon un rayon de courbure r' . En effet, la pression à l'intérieur de la goutte nous est donnée par $P_{goutte} = P_{ID} + 2\gamma/r = P_T + 2\gamma/r'$. Nous en déduisons que $R_{hc} \cdot Q = P_T-P_{IR} = P_T-P_{ID} + \Delta P_I = 2\gamma(1/r-1/r') + \Delta P_I$. Dans le cas extrême où Q est petit devant $\Delta P_I/R_{hc}$ et où r' est petit devant r , nous avons $2\gamma/r' = \Delta P_I$. Tant que $r' > r_c$, la goutte sera seulement déformée, mais dès que $r' = r_c$ la goutte va être aspirée dans le canal et Q va réaugmenter.

Nous avons ainsi accès à deux régimes de travail : un premier où la différence de pression critique $\Delta P_{transfert}$ est supérieure à la différence de pression entre les deux trains ΔP_I et où les deux trains peuvent être manipulés indépendamment, un second où $\Delta P_I > \Delta P_{transfert}$ et où les gouttes du train donneur peuvent être transférées par le canal. En manipulant les gouttes, nous pouvons contrôler ce transfert : des gouttes du train donneur et du train receveur sont positionnées devant le canal, le transfert est initié par la différence de pression entre les trains, puis on bouge la goutte donneuse pour la séparer du volume transféré et pour que la phase continue pousse hors du canal l'échantillon, échantillon qui va fusionner avec la goutte receveuse, tandis que la différence de pression est abaissée.

V.1.B Une vanne microfluidique

Afin d'accélérer le processus, nous ne souhaitons pas modifier à chaque transfert la pression dans l'ensemble du train (ce qui prend quelques secondes). De plus, nous souhaiterions pouvoir rendre nos tuyaux indépendants afin de pouvoir générer un nouveau train ou encore nettoyer le tuyau sans affecter la manipulation de l'autre train dans l'autre tuyau. Pour cela nous avons développé un canal de transfert en polydiméthylsiloxane (PDMS) qui joue le rôle de vanne pneumatique microfluidique à la manière d'une valve de Quake [95] (figure V-3). Le canal microfluidique (de section cylindrique, rayon $r_c = 25\mu\text{m}$, longueur 2mm) reliant les deux tuyaux est en élastomère, nous pouvons donc le comprimer pour modifier localement son rayon jusqu'à le fermer complètement. La pression permettant la fermeture du canal est appliquée dans deux cavités se trouvant de part et d'autre du canal. Ces cavités sont des cylindres de rayon $500\mu\text{m}$ et dont l'extrémité du cylindre se trouve à moins de $50\mu\text{m}$ du canal. Une pression de 1bar appliquée dans ces deux cavités permet de fermer le canal en moins d'une centaine de milliseconde, tandis que le relâchement de la pression prend actuellement environ 200ms.

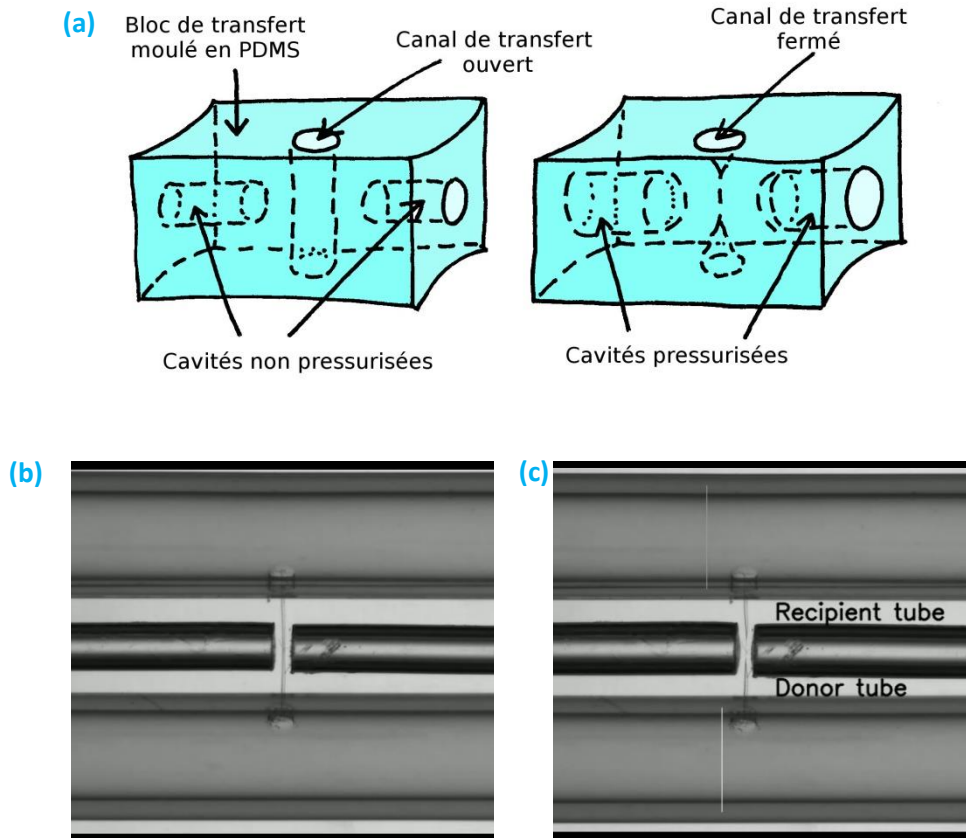


Figure V-3 : (a) schéma d'un bloc de transfert moulé en PDMS. Il est placé entre deux tuyaux (d'où la forme concave des surface du bas et du haut). Les cavités cylindriques sont de part et d'autre du canal. Quand elles ne sont pas pressurisées le canal est ouvert, quand elles le sont, le PDMS se déforme et ferme le canal. (b-c) photographie du bloc de transfert fixé sur deux tuyaux, en position ouverte (b) et fermée (c) (photographies A. S. Chaurasia)

Dans ces conditions, nous maintenons une différence de pression $\Delta P_1 = 100 \text{ mbar} > \Delta P_{\text{transfert}}$. Nous choisissons les gouttes donneuses et receveuses et nous n'avons qu'à ouvrir le canal pour transférer un volume d'une goutte vers une autre. Nous bougeons ensuite légèrement la goutte donneuse afin de libérer la jonction I, puis nous fermons le canal après avoir poussé les reliquats de gouttes avec un flux de phase continue vers la goutte receveuse. Le débit de milieu provenant de la goutte donneuse est de l'ordre de $0.2 \mu\text{L/s}$ pour notre système, nous pouvons contrôler le volume transféré en ouvrant plus ou moins longtemps la vanne. La manipulation des gouttes, assurée par la différence de pression appliquée aux extrémités des tuyaux, est contrôlée par analyse dynamique d'images de la jonction I pour suivre précisément la position des gouttes, la taille des tuyaux nous permet en effet, d'avoir une excellente réactivité du train de gouttes (quelques centaines de millisecondes) autorisant une manipulation précise en vitesse et en position des gouttes. C'est la seule méthode qui nous permette de réellement contrôler notre train de gouttes en vitesse et en position, ce qui est tout à fait nouveau dans les microsystèmes. Pour la première fois, des gouttes peuvent être finement contrôlées et nous travaillons à rendre notre système plus robuste et plus rapide pour pouvoir significativement augmenter le nombre de gouttes manipulables. Pour des gouttes de $10 \mu\text{L}$, si nous souhaitons effectuer un transfert de 1% de la population (soit 100 nL), toutes les opérations de manipulation des gouttes et de transfert peuvent ainsi se faire actuellement en deux secondes par goutte de manière robuste, et nous devrions faire passer cette durée en dessous de la seconde.

La gravité influence notre train de gouttes à cette échelle et nous la mettons à profit dans nos transferts. Tout d'abord, par symétrie, le canal de transfert est disposé à l'horizontale : ses extrémités sont à la même hauteur. Nous générons des séparateurs d'air de petite taille afin qu'ils ne soient pas confinés par le bas et que le train soit moins compressible. Comme nous souhaitons ne pas transférer les séparateurs d'air, le canal de transfert est connecté à la partie inférieure des tuyaux, ainsi seule la phase continue est exposée à la jonction I (figure V-4).

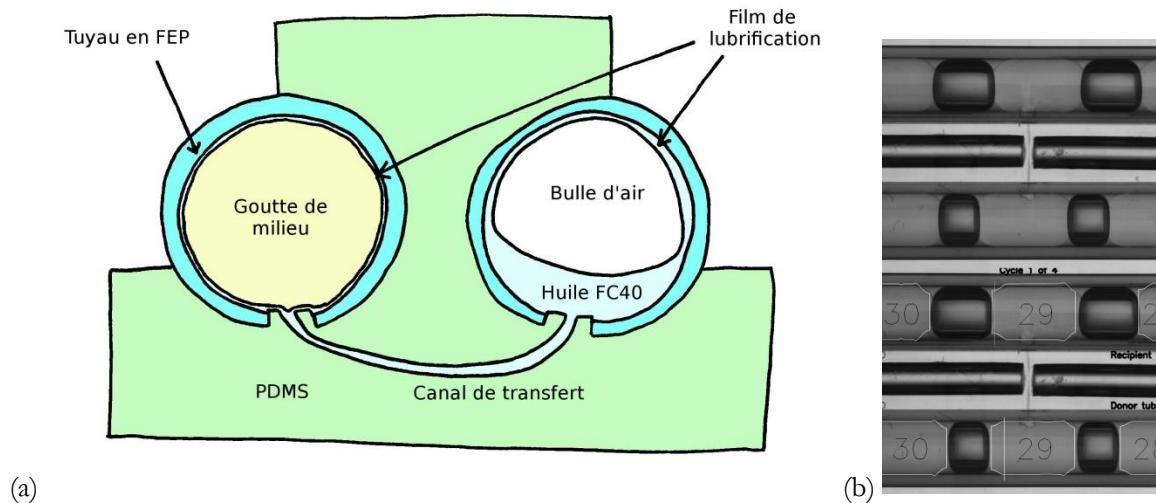


Figure V-4 : (a) schéma d'une vue de coupe du bloc de transfert. Le canal (ici ouvert) est connecté au bas des deux tuyaux pour ne pas aspirer de bulles d'air. Les côtés des tuyaux ne sont pas recouverts de PDMS pour améliorer la détection et le suivi dynamique des gouttes. Les cavités pneumatiques ne sont pas représentées, elles sont perpendiculaires au plan de coupe, à l'avant et à l'arrière. (b) Photographie du bloc de transfert (vue de dessus filmée), avec canal de transfert au centre (ici en position fermée) des deux tuyaux contenant des trains de gouttes, en haut et en bas de la photographie, et des cavités pneumatiques, de part et d'autre du canal. La photographie du bas est traitée dynamiquement sous Python pour repérer et positionner les gouttes (photographie A. S. Chaurasia).

Les caractéristiques du canal (rayon, longueur) influencent le transfert, c'est-à-dire notre gamme de pression, le débit de fluide et la gamme de volumes que nous pouvons précisément transférer. Ces caractéristiques sont modulables grâce à notre procédé de fabrication. En effet, la taille caractéristique de notre système n'est pas non seulement pratique pour cultiver des populations et pour les faire évoluer ainsi que pour manipuler très rapidement des gouttes, mais il facilite aussi la conception des systèmes fluidiques. Le module de transfert est ainsi moulé dans un système tridimensionnel qui est un négatif de la forme des canaux et cavités que nous souhaitons obtenir. Ce moule est un assemblage complexe et très précis de tubes en PTFE, de fils métalliques calibrés et de pièces imprimées en 3D par extrusion. Ces pièces sont assemblées sous microscope pour former un moule dans lequel du PDMS non réticulé est injecté et réticulé à 60°C pendant une nuit. La surface du canal de transfert en PDMS (déjà hydrophobe) est ensuite traitée par silanisation pour la rendre plus hydrophobe, afin d'éviter que le milieu transféré ne mouille la surface du canal).

Nous pouvons noter pour finir qu'il n'y a pas limite de volume transféré pour ce module de transfert. Le transfert va se faire goutte à goutte, celle-ci vont fusionner au fur et à mesure avec la goutte receveuse (figure V-5). Il est ainsi possible de transférer intégralement une goutte d'un train vers un autre et même de générer un train de gouttes à partir de ce module de transfert.

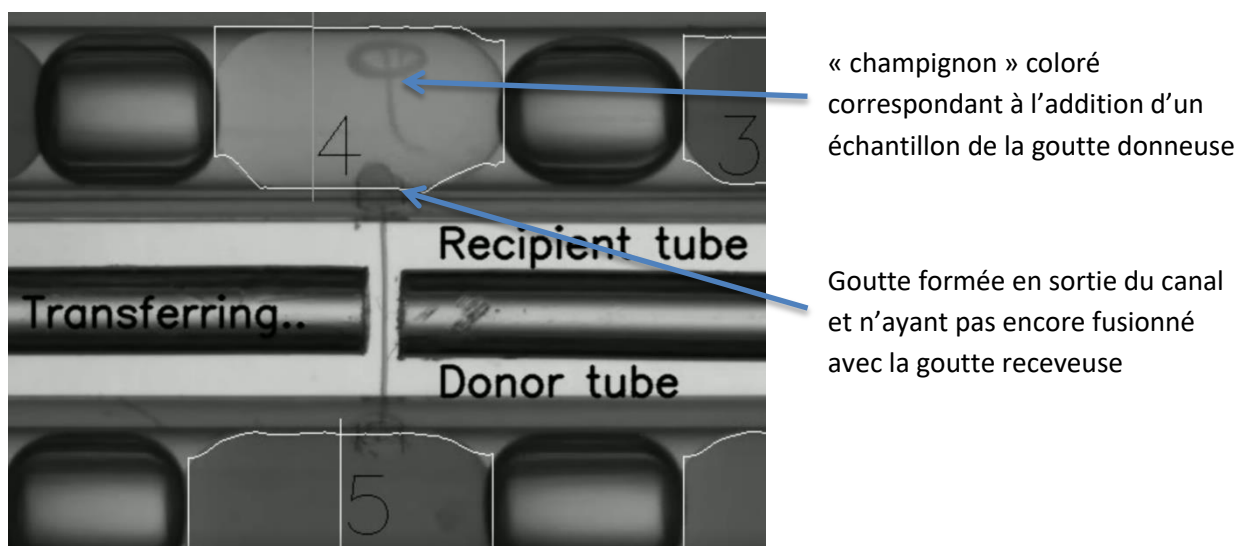


Figure V-5 : Vue de dessus du bloc de transfert lors du transfert entre deux gouttes. Le tuyau du bas est à une pression plus importante que le tuyau du haut. En ouvrant le canal de transfert, un flux de la goutte du bas (notée 5) est transféré vers la goutte du haut (notée 4). Une goutte se forme à la sortie du canal. Lorsque celle-ci coalesce avec la goutte receveuse, elle se détache du flux venant du canal de transfert. Le mélange de la goutte venant de coalescer avec la goutte receveuse peut se visualiser en colorant la goutte donneuse, nous pouvons ainsi voir un « champignon » coloré dans la goutte receveuse (photographie A. S. Chaurasia).

V.2 Un instrument pour le transfert en série

Nous bénéficions désormais d'une méthode permettant de transférer un volume choisi et paramétrable de liquide entre des gouttes sélectionnées d'un train de gouttes et celles d'un autre train. Le dispositif millifluidique déployé dans le chapitre II doit ainsi être dupliqué pour former ce nouvel instrument, et les systèmes de génération et de tri de sortie des gouttes doivent être adaptés. Nous présenterons dans cette partie le fonctionnement de notre instrument pour réaliser des cultures en chemostat (donc sans sélection sur les populations) sur de longues durées. Le protocole correspondant peut se résumer en quelques étapes (instrument schématisé sur la figure V-6), toutes automatisées sauf si précisé :

- 1- Introduire manuellement des réactifs (biologiques ou chimiques) dans l'instrument sous la forme d'un premier train donneur,
- 2- Fabriquer un train de gouttes vierges (nouveau train receveur) dans le tuyau vide,
- 3- Transférer les échantillons voulus du train donneur vers le train receveur,
- 4- Incuber et mesurer le train receveur jusqu'à l'étape 3 (il deviendra alors le nouveau train donneur),
- 5- Terminer l'incubation et les mesures du train donneur,
- 6- Jeter automatiquement le train donneur ou le sortir manuellement sur plaque. Revenir à l'étape 2.

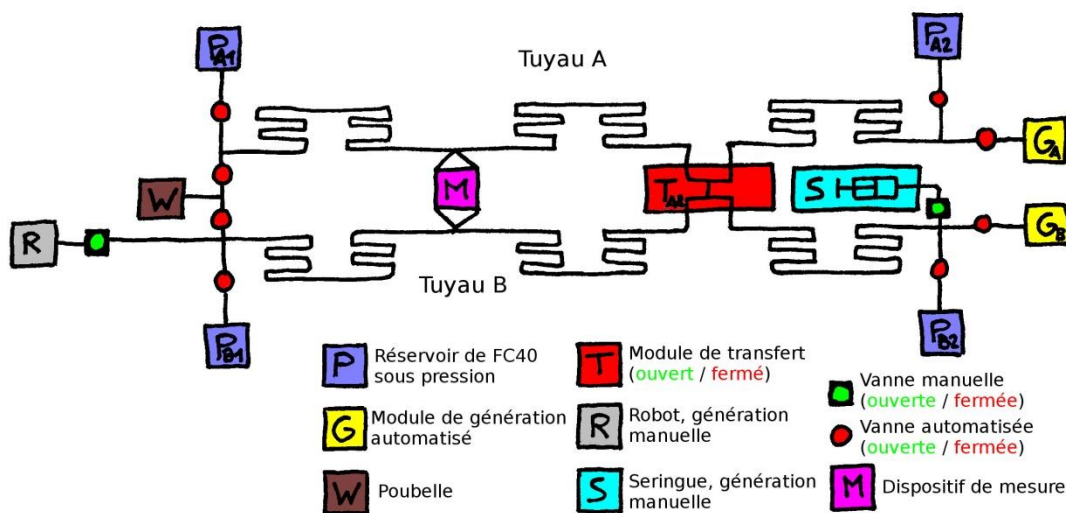


Figure V-6 : schéma fonctionnel de l'instrument. Les vannes manuelles sont en position ouverte (en vert), tandis que les vannes automatisées et le module de transfert sont en position fermée (en rouge), ce qui correspond à l'étape n°1.

1 Introduction des réactifs

Il est nécessaire d'introduire au départ les échantillons biologiques que nous souhaitons cultiver en chemostat. Le système décrit dans le chapitre II par robot pipeteur est la méthode employée. Cette première étape ne demande pas de précaution particulière (à part des conditions stériles) et peut être réalisée rapidement (la précision du volume des gouttes formées n'est pas importante) et avec quelques contaminations entre gouttes si elles sont toutes identiques (sinon on ajoutera des gouttes tampon intermédiaires). Une fois le train de gouttes introduit dans un des tuyaux d'incubation, le bras robotisé est

isolé de l'instrument par une vanne manuelle. Désormais, les systèmes biologiques cultivés dans l'instrument sont totalement isolés et ne peuvent plus être contaminés par une source extérieure.

2 Fabrication d'un nouveau train

Nous générons automatiquement les trains de gouttes à l'aide d'une jonction X comme décrit en II-2-B dans le cas des séparateurs d'air. Les variations de la pression au niveau de cette jonction sont plus faibles pour des tuyaux de rayon 1.1mm plutôt que de 375 μ m pendant la formation d'un train de gouttes. Il s'ensuit que le train de gouttes est pratiquement homogène bien que les séparateurs soient compressibles et que le débit d'air à la jonction puisse varier. Tous les éléments de la génération sont thermostatés dans l'instrument, à 37°C, température d'incubation, pour le moment.

Les trois phases entrent ainsi dans la jonction sous pression, la phase aqueuse est issue d'un gros réservoir de milieu de culture M9+G pressurisé et la phase continue d'un réservoir pressurisé. L'air arrivé sous pression d'un pressostat est filtré à 0.2 μ m (pour éviter l'entrée de contaminations) avant de pressuriser les réservoirs ou d'atteindre la jonction. Les réservoirs et l'arrivée d'air sont séparés de la jonction par des longs capillaires opposant ainsi une forte résistance à l'écoulement, de manière à ce que la différence de pression imposée entre le pressostat et la jonction soit beaucoup plus grande que les variations de pression au niveau de la jonction. Nous nous assurons ainsi que les débits d'air, de milieu et d'huile varient peu durant la génération. Dans ces conditions, nous fabriquons un train homogène de 1000 gouttes en 40 minutes.

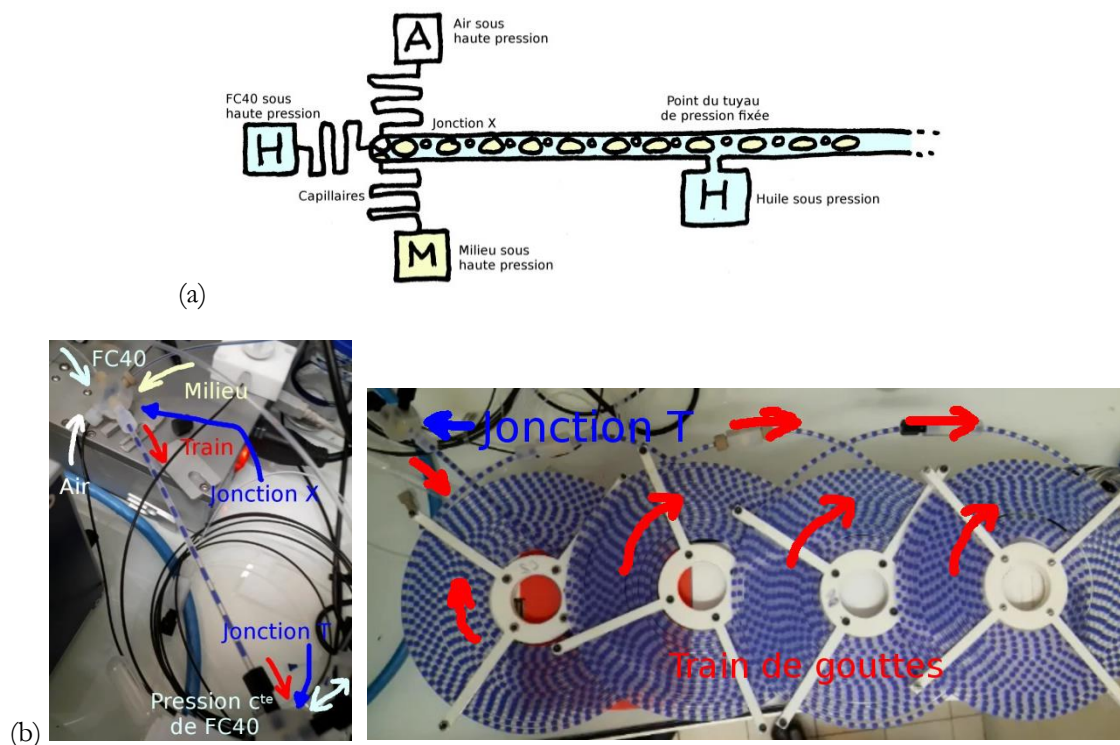


Figure V-7 : (a) schéma de la génération d'un train de gouttes avec une jonction X et avec une adaptation de la pression pour former des gouttes de taille homogène. (b) photographie d'un train généré selon cette méthode (pour une distance entre les jonctions de 15cm et une petite résistance placée entre le tuyau et l'huile à pression constante), les conditions ne sont pas optimales mais permettent de générer plusieurs milliers de gouttes de manière robuste.

Pour améliorer ces performances, nous avons développé un système amélioré : nous fixons un point de pression constante en aval de la jonction X (figure V-7) afin que la pression au niveau de cette jonction ne soit pas affectée par la longueur du train (qui modifie la résistance hydrodynamique de l'émulsion en aval de ce point de pression fixée). Ce point de pression constante est une jonction T reliée à un réservoir pressurisé d'huile fluorée par un tuyau de résistance négligeable. Ainsi, un léger débit d'huile fluorée entrant dans le train a lieu au niveau de la jonction T et vient diluer le train. Ce léger débit va, lui, varier pour permettre à la pression de rester constante au niveau de la jonction X. Ainsi, si la proportion de phase continue va varier dans le train, les gouttes seront néanmoins homogènes, même pour de longs trains.

Cette jonction T doit être éloignée de la jonction X d'une distance beaucoup plus grande que la longueur d'un motif du train de gouttes (6mm ici) afin que la résistance hydrodynamique de la tranche de train comprise entre ces deux jonctions ne fluctue pas. Nous avons arbitrairement placé la jonction à 0.6m. Dans ces conditions, nous avons voulu pousser le système de génération à son maximum pour évaluer la variation de taille de goutte sur des grands trains. Une fois que le front du train généré dépasse la jonction T, nous pouvons considérer que les conditions de génération sont stables. Nous avons ainsi généré un train de gouttes, à une fréquence estimée à 1.3 goutte/s) dans un tuyau initialement rempli d'huile fluorée de 100m de long, correspondant à une capacité estimée à 15000 gouttes (le tuyau a été intégralement rempli), mais nous n'avons pas observé de fluctuation significative de taille entre les 100 dernières gouttes et les 100 générées après les 200 premières gouttes (nous voulons nous assurer que la génération est bien stabilisée), ce qui est très encourageant pour les développements futurs de notre instrument (figure V-8).

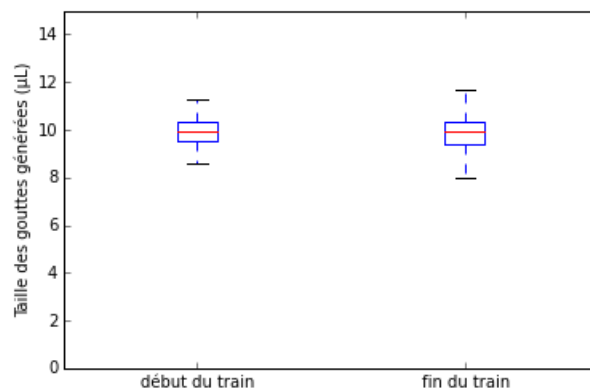


Figure V-8 : Un train d'environ 15000 gouttes a été généré à l'aide du dispositif comprenant une génération de gouttes par X et une jonction T (à 60cm) maintenant un flux de FC40 sous pression constante. Nous avons mesuré la longueur des 100 gouttes au début du train et à la fin du train (par analyse d'image) et nous comparons ces valeurs sur la figure. L'écart-type de la distribution des tailles semble ainsi légèrement augmenter mais nous n'observons pas de déviance significative de la taille des gouttes durant la génération.

3 Transfert

Le transfert de goutte se fait actuellement selon la méthode décrite en V-1, c'est-à-dire en stoppant les gouttes concernées par un transfert face à la jonction I. Nous pourrions améliorer la rapidité du système en effectuant ces transferts en dynamique sans arrêter les trains à condition de calibrer les pressions appliquées en conséquence. En particulier, un premier passage du train devant la caméra (qui filme le module de transfert et est utilisé pour positionner les gouttes) serait nécessaire pour évaluer ses propriétés et comportement et adapter en conséquence son mouvement dynamique pour effectuer un transfert rapide.

4 et 5 Incubation et Mesure

Comme décrit dans le chapitre II, la mesure est effectuée par fluorescence pendant que le train de gouttes est incubé à 37°C en faisant des allers et retours autour du point de mesure. Ce dernier n'est, cependant, plus au centre du tuyau : le point de mesure et le module de transfert sont respectivement à 1/3 et à 2/3 de la longueur de chaque tuyau (figure V-5). En effet, il est inutile que le train de gouttes traverse le module de transfert, cause supplémentaire de contaminations, pendant son incubation.

Nous continuons à mesurer la croissance des populations après transfert car le transfert peut avoir lieu avant que la croissance n'atteigne le plateau de saturation, et nous pouvons souhaiter mesurer la courbe de croissance totale de la population. D'un point de vue plus général, nous pourrions utiliser ces réacteurs pour obtenir des informations sur les populations que nous venons de propager (test de résistance à une espèce chimique, évaluation de la biomasse finale par exemple).

6 Suppression du train précédent

Si nous souhaitons récupérer manuellement les gouttes du train, ce dernier peut être sorti de la machine par la méthode décrite dans le chapitre II en utilisant le bras robotisé. Nous récupérerons ainsi nos réacteurs sur plaque multi-puits pour congélation ou analyses ultérieures. Dans le cas contraire, le train est jeté en routine dans un réservoir contenant un biocide. Le tuyau est purgé et rempli d'huile fluorée pour le vider de bulles d'air éventuelles.

Il est à noter que cette méthode a été mise en œuvre de manière à être intégralement automatisable, ce qui offre à l'expérimentateur la possibilité d'exploiter toute la complexité du dispositif en termes de combinatoire, de fréquence de transferts ou d'étapes expérimentales successives, de nombre de gouttes et de chambres fluidiques.

Nous venons donc de résumer les opérations élémentaires permettant de cultiver par transfert en série des populations de bactéries. Dans ces conditions, il serait possible de pouvoir propager un millier de populations environ toutes les heures, mais nous ne pourrions mesurer que peu de choses de la croissance des populations. C'est pourquoi nous cyclons actuellement toutes les 4h le processus de transfert pour une dilution de l'ordre de 100 (nous ne restons donc pas en phase exponentielle). Cette première preuve de concept de cette technologie pour une culture long terme est en cours.

V.3 Applications

Sur la base de cette technologie de culture continue par transfert en série, nous pouvons envisager des applications plus larges. Si certaines opérations élémentaires semblent triviales à réaliser dans un tel système à deux trains (comme l'isolation d'une souche monoclonale, la création d'un gradient de concentration, ou l'évaluation d'un MIC), de nombreux tests plus élaborés, et d'un intérêt certain pour la sélection artificielle, peuvent nécessiter au moins trois trains de gouttes. De plus, l'addition d'un troisième train de gouttes augmente les nombres de dimensions paramétrables dans notre système : un second train nous permet de choisir la composition biologique de chaque goutte, un troisième train nous permettrait alors de choisir la composition chimique de chaque goutte.

Nous présenterons ainsi schématiquement (avec les mêmes codes que la figure V-5, mais en les simplifiant) pour finir et en guise d'ouverture, deux méthodes adaptées pour l'usage de trois trains de gouttes et liées à ce travail de thèse : la culture de populations dans des milieux très variables et avec peu de contaminations, ainsi que l'évaluation de la diversité de réponse de populations à un stress antibiotique.

V.3.A Diversité des milieux de cultures

Pour effectuer une sélection naturelle avec des conditions artificielles sur des populations, il y a lieu de pouvoir modifier à souhait la composition de son milieu, c'est ce que nous nous sommes proposé ici (figure V-9).

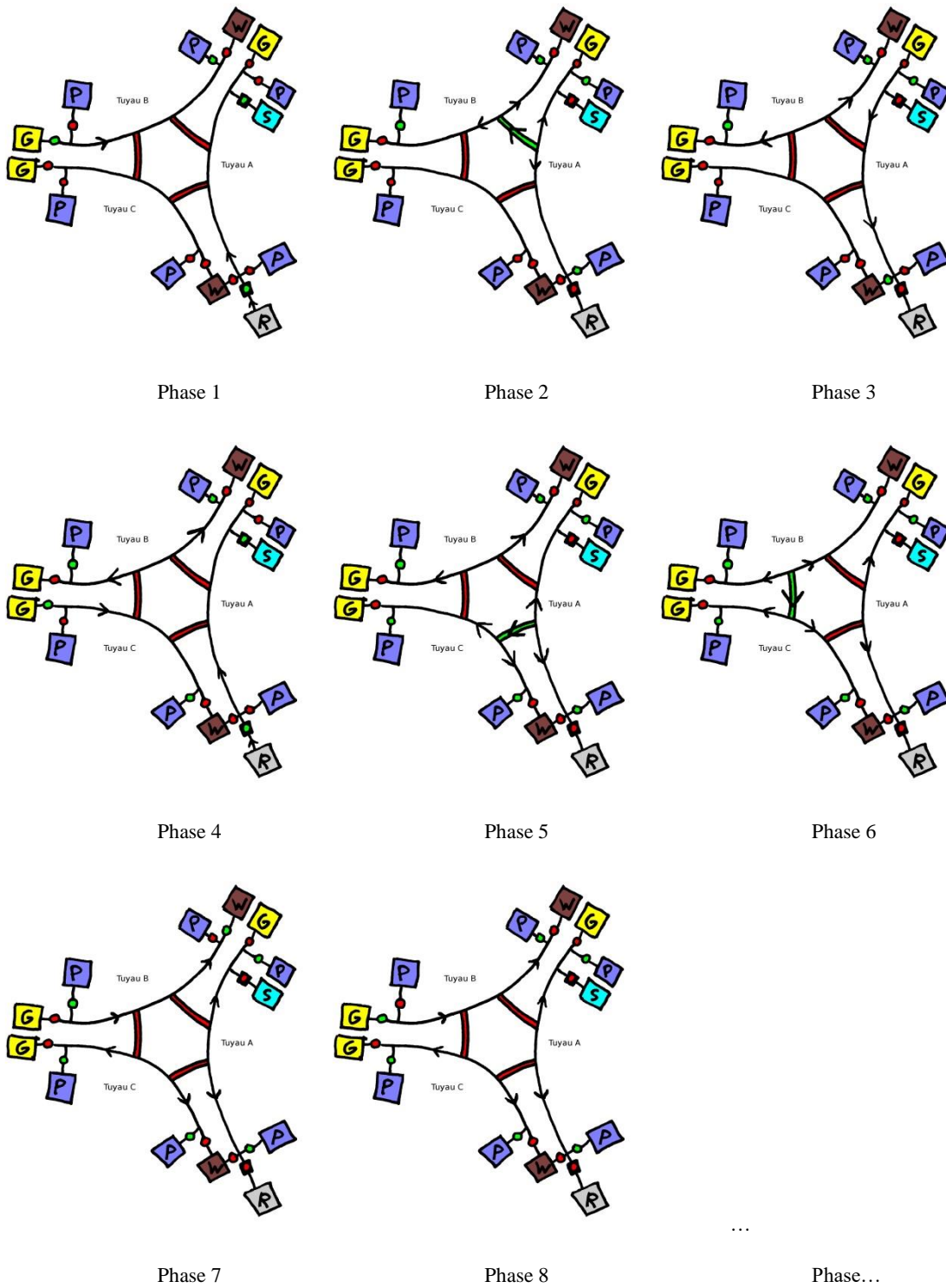


Figure V-9: Cultures de bactéries dans différents milieux, protocole fonctionnel phase par phase : (1) Génération manuelle d'un train contenant les bactéries dans A, génération automatique d'un train dans B. (2) Transfert de A vers B. (3) Incubation dans B, train de A jeté. (4) Génération manuelle d'un train contenant les composés chimiques dans A, incubation dans B, génération automatique d'un train dans C. (5) Transfert de A dans C pour former dans C un train constitué de gouttes ayant des compositions différentes, incubation dans B. (6) Incubation dans A, transfert des bactéries de B dans C. (7) Incubation dans A et C, train de B jeté. (8) Incubation dans A et C, génération automatique d'un train dans B. A partir de maintenant nous pouvons revenir à la phase 5, en échangeant B et C, puis continuer la séquence indéfiniment, jusqu'à épuisement des composés chimiques incubés dans le train de A.

Légende et codes de la figure : les tuyaux sont simplifiés comme étant les trois lignes courbes noires. Ils sont connectés entre eux par trois canaux de transfert représentés par des doubles lignes colorées (rouge ou vert selon s'ils sont ouverts ou fermés, une flèche indique la direction du transfert). Le dispositif de mesure n'est pas représenté. Les représentations des modules de génération, des pressostats, des poubelles, du pousse-seringue, du robot-pipeteur, des vannes manuelles et automatisées, sont identiques à la figure V-5. Le mouvement du courant de la phase continue et donc du train de gouttes est indiqué par des flèches. Le train n'est pas représenté ; si les flèches encadrent un canal de transfert, le train fait des va-et-vient autour de ce canal ; si les flèches encadrent deux canaux, alors le train est incubé ; si les flèches vont toutes dans le même sens alors, le train est soit en train d'être généré soit en train d'être jeté.

Nous pouvons exploiter cette diversité pour réduire les échanges chimiques ou biologiques entre populations. Nous avons vu dans le chapitre III que les contaminations interviennent à la génération d'un train de gouttes et lors de son incubation. Dans les deux cas, les gouttes immédiatement voisines concentrent la majorité des contaminations observées. Nous pouvons donc limiter l'impact des contaminations biologiques et chimiques en insérant entre chaque réacteur une goutte de milieu tampon ne permettant pas la croissance bactérienne et n'affectant pas les populations voisines. Deux solutions sont ici possibles en appliquant la méthode présentée sur la figure :

- Les trains générés ne contiennent pas les éléments minimaux à la croissance bactérienne et ces nutriments seraient ajoutés dans les gouttes choisies à l'issue de la génération.
- Nous pouvons ajouter un inhibiteur de croissance bactérienne dans les gouttes tampons.

V.3.B Diversité de réponses des populations à un stress

Pour effectuer une sélection artificielle sur des populations, il y a lieu de pouvoir évaluer leur diversité. Cette évaluation ne peut pas passer uniquement par la mesure des courbes de croissance ou par d'autres méthodes passives et non destructrices. Par exemple, nous pouvons souhaiter évaluer la résistance à un stress d'une population, mais nous ne souhaitons pas la stresser pour le faire (pour éviter d'appliquer un goulot d'étranglement évolutif trop important par exemple, ou de simplement sélectionner la population de manière interne).

Dans ce cas, il convient de prélever un échantillon de la population et de soit tester l'échantillon, soit tester la population initiale en les consommant. Dans chaque cas, un échantillon sera finalement transféré à la génération suivante de culture. Nous avons donc le choix entre deux points de vue :

- A partir d'une population initiale, transférer deux échantillons, l'un dans une goutte de test et l'autre dans une goutte de culture. La population initiale est jetée (le tuyau est vidé et un nouveau train de gouttes de milieu vierge est formé), celle de culture croît dans son nouveau milieu et l'échantillon test nous informe en croissant (ou non) d'un caractère de la population, en relation avec la nature du milieu de la goutte. En fonction de cette information, nous choisissons de sélectionner favorablement ou non la population pour qu'elle soit transférée vers le nouveau train vierge.
- A partir d'une population initiale, transférer un échantillon dans une goutte de culture vierge d'un nouveau train. Un troisième train est constitué d'une solution stressante. Nous transférons un volume de cette solution vers la goutte contenant la population initiale pour la tester. Pendant ce temps, l'échantillon transféré initialement croît. Nous obtenons le résultat du test puis nous jetons cette goutte test et nous formons un nouveau train vierge. En fonction du résultat du test, nous choisissons de sélectionner favorablement ou non la population pour qu'elle soit transférée vers le nouveau train vierge.

C'est le premier point de vue que nous avons choisi d'illustrer dans la figure V-10.

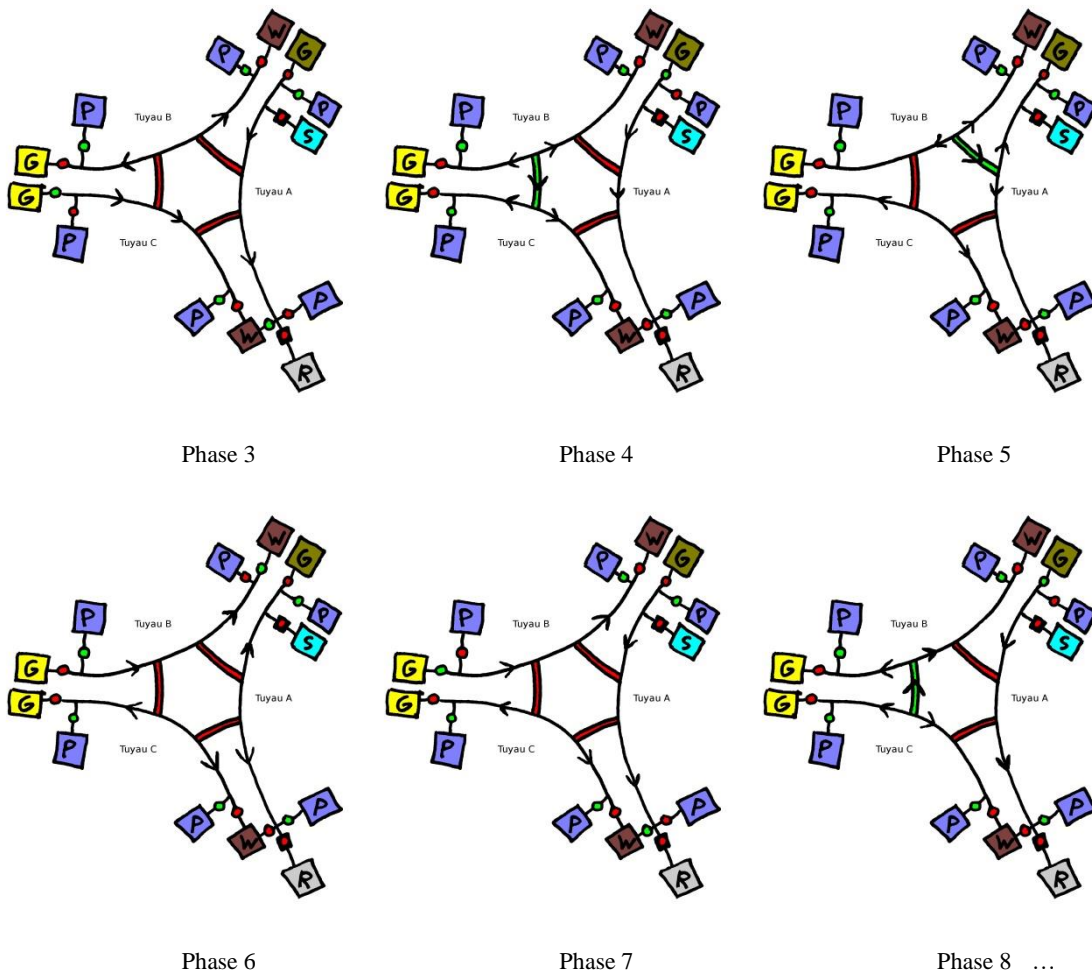


Figure V-10: Cultures de bactéries dans un milieu constant, nous stressons régulièrement un échantillon des cultures pour ensuite sélectionner la culture d'origine en fonction de la réponse au stress, protocole fonctionnel phase par phase : (1) (2) Ces phases sont identiques à la figure V-8 et non représentés. (3) Train de A jeté, incubation dans B, génération automatisée d'un train dans C. (4) Génération automatisée d'un train de gouttes composé de milieu stressant dans A, transfert de B vers C. (5) Transfert de B dans A pour tester la réponse des cultures au stress, incubation dans C. (6) Incubation dans A, train de B jeté, incubation dans C. (7) Après analyse des réponses au stress dans A, le train de A est jeté, génération d'un train dans B, incubation dans C. (8) Génération automatisée d'un train de gouttes composé de milieu stressant dans A, transfert de C vers B en sélectionnant les cultures transférées en fonction des résultats du test de résistance précédent. A partir de maintenant, nous pouvons revenir à la phase 5, en échangeant B et C, puis continuer la séquence indéfiniment. La légende et les codes de la figure sont identiques à ceux de la figure V-8, à l'exception du module de génération du tuyau A qui est en jaune grisé, car le milieu est stressant dans son cas.

V.5 Conclusion

Nous avons introduit et mis en application simplement dans ce chapitre, une réalisation technologique pouvant permettre de réaliser durablement des expériences à long terme d'évolution dirigée sur des populations de micro-organismes. En mettant en application nos connaissances sur la gestion des contaminations, l'évaluation de la diversité et la gestion des populations, nous devrions sous peu avoir un instrument adapté à ces objectifs ambitieux et à plus court terme, capable de répondre à nos besoins.

La technologie mise en œuvre ici, présente de plus un potentiel plus étendu qu'aux seules cultures microbiologiques. Le module de transfert, en faisant le lien entre millifluidique et microfluidique, ouvre la possibilité de créer des ponts entre les différentes technologies et les différentes échelles. Cette technologie offre en particulier un multiplexage massif des échantillons et pourrait permettre d'intégrer certaines techniques d'analyses miniaturisées.

Conclusion générale

Cultiver un grand nombre de populations de bactéries en parallèle sur le long terme est l'un des enjeux technologiques nécessaire à l'évolution dirigée. Maintenir des cultures dans des conditions similaires à un chemostat en les propageant par transfert en série représentait déjà un objectif ambitieux que la technologie de la millifluidique digitale semblait pouvoir permettre. Détourner ce mode de culture pour conditionner la structure d'une métapopulation, y détecter l'apparition de diversités et être capable de la sélectionner à haut débit, relève du rêve de tout microbiologiste de l'évolution. Dans ces travaux de thèse, un nouveau dispositif pour la culture multi-parallélisée de communautés de bactéries a été développé, caractérisé puis finalement modifié pour tendre vers ces aspirations.

Notre technologie partage la plupart des caractéristiques des autres méthodes de cultures, celles de manipuler individuellement de grandes populations, de suivre leur croissance de manière quantitative, et de propager les cultures étudiées. Seule la millifluidique offre pourtant une parallélisation appréciable de cultures de grandes tailles et ce, de manière automatisable, à haut débit, et à coût raisonnable. En modifiant la technologie selon deux axes, la diversification des cultures et l'augmentation de leur taille, nous avons pu placer notre instrument dans les conditions requises pour sélectionner artificiellement des populations.

Les contaminations croisées des cultures pouvait devenir un problème maintenant que nous incubons des cultures hétérogènes. Nous les avons donc évaluées pour les différents modules de notre instrument. Les échanges entre gouttes se font en majorité de proche en proche, par transfert de volume et sont systématiques. Ces contaminations sont plutôt stochastiques lors de la préparation des cultures, mais constante lors de l'incubation.

La diversité peut apparaître en un faible nombre de générations, c'est ce que nous avons montré en réalisant un protocole de fluctuation adapté à notre instrument. En contrôlant la fusion entre échantillons, nous avons pu mesurer la réponse d'une collection de populations à un stress antibiotique. Nous avons mis en évidence une très forte disparité de résistance des populations à proximité de la concentration minimale inhibitrice de la souche de *E. coli* utilisée face à la gentamicine. Cette méthode est complexe à mettre en œuvre, et elle pourrait affecter la réponse des bactéries au stress. Nous avons donc souhaité nous tourner vers d'autres solutions technologiques.

Nous avons conclu ces travaux de thèse en concevant un nouveau module technologique pouvant répondre aux différents enjeux de la culture des communautés et apportant une solution aux limitations expérimentales que nous avons rencontrées. Cette nouvelle technologie permet, en prélevant automatiquement des échantillons dans une population pour les introduire dans de nouveaux milieux, de réellement cultiver des populations, d'évaluer leur diversité, et de pouvoir les sélectionner artificiellement à

haut débit. Si cette technologie est encore en développement, elle nous semble néanmoins très prometteuse pour diriger l'évolution sur mesure de populations de micro-organismes.

Nous sommes convaincus que nous tenons ici un instrument qui pourra faire évoluer des communautés et qu'il s'agit de la bonne approche pour concevoir des produits biologiques durables. L'évolution et la diversité sont des sujets qui nous tiennent à cœur et qui nous passionnent. Pouvoir jouer avec les sélections naturelles, aléatoires, et artificielles nous tente beaucoup. Nous avons profité de cette thèse pour approfondir leur compréhension. Même si cela n'est apparu qu'au cours du premier chapitre de ce tapuscrit, nous comptons profiter de ces acquis pour pouvoir continuer à pousser plus loin cette technologie. Celle-ci est en cours de dépôt de brevet et une petite équipe se monte autour de ce projet que nous avons contribué à lancer et dans lequel nous allons continuer à nous investir. Nous n'avons aucun doute sur l'avenir de notre instrument : pas un chercheur ne vient visiter notre laboratoire sans en repartir en proposant de nouvelles idées d'applications. L'avenir semble donc plein de promesses.

Annexes

Annexe 1 : Compléments sur deux effets de la dérive génétique

Théorie des glissements d'équilibre

Wright suggère dans cette théorie qu'une évolution adaptative peut se produire plus rapidement ou atteindre des optimaux adaptatifs difficiles à rejoindre, quand une population est subdivisée en sous-populations relativement isolées, et donc soumises à la dérive génétique [98]. Cette dernière peut donc se révéler être aussi un moteur d'évolution même si cette théorie, comme son impact réel sur l'évolution des espèces, demeure controversée [22].

Pour comprendre cette théorie, il suffit de visualiser l'adaptation d'une population grâce à un paysage adaptatif. Une population de grande taille est « piégée » dans un optimum adaptatif car elle varie assez peu, de par sa taille (et une pression de sélection). Une sous-population va beaucoup plus varier et peut statistiquement passer la vallée adaptative et alors être sélectionnée vers un autre optimum adaptatif.

Paradoxe de la dérive génétique : L'effet de Yule-Simpson

Comme nous l'avons vu, la dérive génétique est essentiellement un phénomène stochastique, en ce sens l'évolution peut être conditionnée par des paradoxes statistiques. Nous pouvons en particulier citer celui de Simpson, dans lequel un phénomène présentant une tendance dans chaque groupe peut présenter la tendance inverse lorsque les groupes sont combinés.

En biologie, le paradoxe de Simpson peut intervenir lorsqu'une population est séparée en plusieurs sous-populations indépendantes qui communiqueront ensemble (fusionneront dans le cas extrême) après un certain temps t et dont la taille au temps t (de chaque sous-groupe avant échanges intergroupes) est dépendante de la diversité intra-spécifique de chaque sous-population. Par exemple, si une population est constituée de deux phénotypes de valeurs reproductives différentes, la proportion d'un des deux phénotypes devrait tendre vers une valeur nulle au cours du temps, pourtant si la proportion en ce phénotype accroît « suffisamment » la taille de la population à un moment donné (toutes proportions des deux phénotypes conservées par ailleurs), il est possible que la proportion globale (sur toutes les sous-populations) de ce phénotype augmente au cours du temps [74], par des cycles d'isolation de sous-populations - fusion des sous-populations.

Nous pouvons ainsi bien écrire que la dérive génétique peut engendrer un paradoxe biologique, car le résultat du processus va à l'encontre des lois de la sélection : le plus adapté (en terme de reproduction) n'est pas nécessairement le seul à transmettre ses caractères sur le long terme. Ainsi, on peut comprendre que l'effet de Yule-Simpson va sélectionner les populations présentant certaines propriétés particulières, notamment l'existence d'une corrélation entre la proportion des phénotypes et la biomasse finale. Dans ces conditions, cet effet peut d'une part lutter contre la perte d'un phénotype (et donc contrebalancer la sélection naturelle ou la dérive génétique), mais aussi favoriser les interactions bénéfiques intra-population : cet effet peut favoriser l'émergence de symbioses.

Annexe 2 Compléments sur les Contaminations chimiques

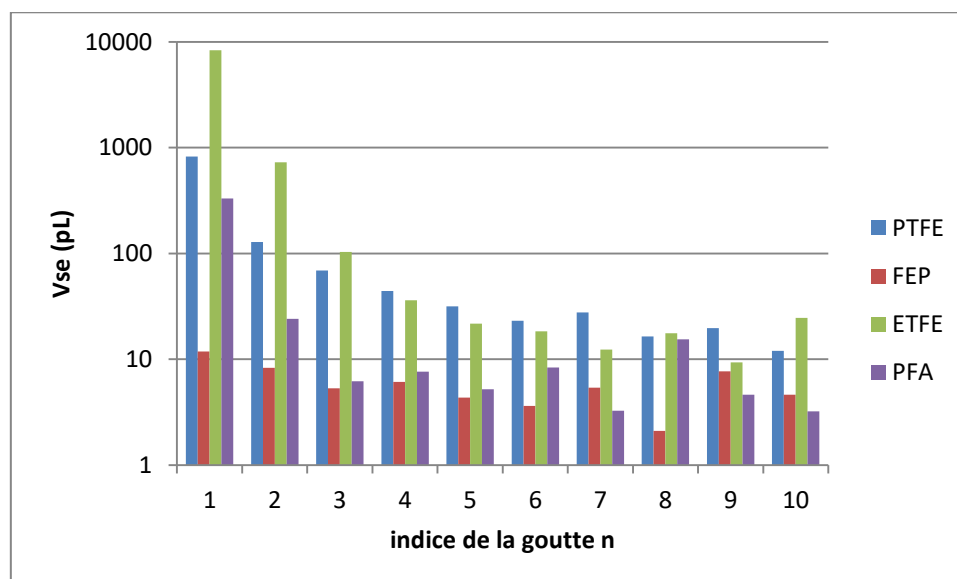
Impact des paramètres de génération complémentaires

Nous avons étudié l'impact du débit d'aspiration, du volume des gouttes, du temps de résidence dans un puits et de la profondeur de pénétration dans le milieu d'un puits sur les transferts entre gouttes se suivant dans le cas du système de génération choisi précédemment. Ces paramètres ne variant pas totalement indépendamment, nous avons réalisé cinq séries d'expériences avec des paramètres différents (nous avons précisé en premier les résultats obtenus précédemment dans les conditions standard). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau :

Débit d'aspiration (mL/h)	25	10	25	25	50	5
Volume goutte (μL)	20	20	20	80	25	20
T résidence (s)	3	7	3	10	1.5	15
Profondeur (mm)	5	5	8	5	5	5
Vse n=+1 (pL)	19 \pm 7	25 \pm 11	17 \pm 8	21 \pm 7	19 \pm 9	32 \pm 20

Des différents paramètres de génération, il semble que seul le débit d'aspiration présente un léger impact sur les transferts entre gouttes. Aux débits plus faibles que 25mL/h les transferts entre gouttes semblent augmenter. En diminuant le débit, et donc la vitesse des gouttes, l'épaisseur du film de lubrification diminue lui aussi, il est donc possible que le mouillage soit plus important.

Passage au travers d'une jonction : Vse pour n>1



Bibliographie

- [1] Alakbarli, Farid. 2001. A 13th-Century Darwin, Tusi's Views on Evolution. *Azerbaijan International* 9.2 48-49.
- [2] Andersson, Dan I. et Diarmaid Hughes. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates*, 15, 162-172. DOI: 10.1016/j.drug.2012.03.005.
- [3] Ayala, Francisco J. 1995. The myth of Eve: molecular biology and human origins. *Science*, 270 (5244), 1930-1936.
- [4] Baquero, Fernando, Maria-Cristina Negri, Maria-Isabel Morosini et Jesús Blázquez. 1998. Antibiotic-selective environments. *Clinical Infectious Diseases*, 27 (issue supplement 1), 5-11. DOI: 10.1086/514916.
- [5] Baraban, Larysa, Fabien Bertholle, Merijn L. M. Salverda, Nicolas Bremond, Pascal Panizza, Jean Baudry, J. Arjan G. M. de Visser and Jérôme Bibette. 2011. Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a Chip*, 11, 4057-4062. DOI: 10.1039/c1lc20545e.
- [6] Baroud, Charles N., François Gallaire et Rémi Danga. 2010. Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, 10, 2032-2045. DOI: 10.1039/C001191F.
- [7] Barrick, Jeffrey E., Dong Su Yu, Sung Ho Yoon, Haeyoung Jeong, Tae Kwang Oh, Dominique Schneider, Richard E. Lenski et Jihyun F. Kim. 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 461, 1243-1247. DOI: 10.1038/nature08480.
- [8] Basaran, Osman A. 2004. Small-scale free surface flows with breakup: Drop formation and emerging applications. *AICHE Journal*, 48 (9), 1842-1848. DOI: 10.1002/aic.690480902.
- [9] Baym, Michael, Tami D. Lieberman, Eric D. Kelsic, Remy Chait, Rotem Gross, Idan Yelin et Roy Kishony. 2016. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*, 353 (6304), 1147-1151. DOI: 10.1126/science.aag0822.
- [10] Bertholle, Fabien. 2010. Milli-fluidique digitale pour la microbiologie. UPMC.
- [11] Billington, H L. 1991. Effect of population size on genetic variation in a dioecious conifer. *Conservation Biology*, 5 (1), 115-119. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1991.tb00394.x.
- [12] Bird, Adrian. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16, 6-21. DOI: 10.1101/gad.947102.

- [13] Bretherton, F. P. 1961. The motion of long bubbles in tubes. *Journal of Fluid Mechanics*, 10 (2), 166-188. DOI: 10.1017/S0022112061000160.
- [14] Carson, Hampton L. 1990. Increased genetic variance after a population bottleneck. *Trends in Ecology & Evolution*, 5 (7), 228-230. DOI: 10.1016/0169-5347(90)90137-3.
- [15] Chabert, Max, Kevin D. Dorfman, Patricia de Cremoux, Johan Roeraade et Jean-Louis Viovy. 2006. Automated Microdroplet Platform for sample manipulation and polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 78 (22), 7722-7728. DOI: 10.1021/ac061205e.
- [16] Chabert, Max. 2007. Microfluidique de gouttes pour les analyses biologiques. UPMC.
- [17] Chalfie, Martin, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W. Ward et Douglas C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 (5148), 802-805. DOI: 10.1126/science.8303295.
- [18] Christopher, Gordon F. et Shelley L. Anna. 2007. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40, 319-336. DOI: 10.1088/0022-3727/40/19/R01.
- [19] Clawson, David L. 1985. Harvest security and intraspecific diversity in traditional tropical agriculture. *Economic Botany*, 39 (1), 56-67.
- [20] Cottinet, Denis. 2013. Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli* étudiées en millifluidique digitale. UPMC.
- [21] Cornforth, Daniel M. et Kevin R. Foster. 2013. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 285-293. DOI: 10.1038/nrmicro2977
- [22] Coyne, Jerry A., Nicholas H. Barton et Michael Turelli. 1997. Perspective: a critique of Sewall Wright's shifting balance theory of evolution. *Evolution*, 51 (3), 643-671. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1997.tb03650.x.
- [23] Curcui, Mario et Johan Roeraade. 2003. Continuous segmented-flow polymerase chain reaction for high-throughput miniaturized DNA amplification. *Analytical Chemistry*, 75, 1-7. DOI: 10.1021/ac0204146.
- [24] Da Re, Sandra, Benjamin Le Quéré, Jean-Marc Ghigo et Christophe Beloin. 2007. Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (10), 3391-3403. DOI: 10.1128/AEM.02625-06.
- [25] Damodaran, Shima P., Stephan Eberhard, Laurent Boitard, Jairo Garnica Rodriguez, Yuxing Wang, Nicolas Bremond, Jean Baudry, Jérôme Bibette et Francis-André Wollman. 2015. A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS One*, 10 (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0118987.
- [26] de Menech, M., Piotr Garstecki, F. Jousse et Howard A. Stone. 2006. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction. *Journal of Fluid Mechanics*, 595, 154-161. DOI: 10.1017/S002211200700910X.
- [27] Dorfman, Kevin D., Max Chabert, Jean-Hugues Codarbox, Gilles Rousseau, Patricia de Cremoux et Jean-Louis Viovy. 2005. Contamination-free continuous flow microfluidic

polymerase chain reaction for quantitative and clinical applications. *Analytical Chemistry*, 77 (11), 3700-3704. DOI: 10.1021/ac050031i.

- [28] Duetz, Wouter A., Lorenz Rüedi, Robert Hermann, Kevin O'Connor, Jochen Büchs et Bernard Witholt. 2000. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6), 2641-2646. DOI: 1128/AEM.66.6.2641-2646.2000.
- [29] Duetz, Wouter A. 2007. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends in Microbiology*, 15 (10), 469-475. DOI: 10.1016/j.tim.2007.09.004.
- [30] Durka, Walter, Wieslaw Babik, Jean-François Ducroz, Dietrich Heidecke, Frank Rosell, Ravčigijn Samjaa, Alexander P. Saveljev, Annegret Stubbe, Alius Ulevičius et Michael Stubbe. 2005. Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. *Molecular Ecology*, 14, 3843-3856. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02704.x.
- [31] Dykhuizen, Daniel E. et Daniel L. Hartl. 1983. Selection in Chemostats. *Microbiology Reviews*, 43 (2), 150-168.
- [32] Elena, Santagio L. et Richard Lenski. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 4, 457-469. DOI: 10.1038/nrg1088.
- [33] Elowitz, Michael B., Arnold J. Levine, Eric D. Siggia et Peter S. Swain. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297 (5584), 1183-1186. DOI: 10.1126/science.1070919.
- [34] Erdey, László, William F. Pickering et Carole L. Wilson. 1962. Mixed chemiluminescent indicators. *Talanta*, 9 (4), 371-375. DOI: 10.1016/0039-9140(62)80081-2.
- [35] Finkel, Steven E. et Roberto Kolter. 1999. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 96 (7) 4023-4027. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4023.
- [36] Garnica, Jairo Ivan, Laurent Boitard, Antoine S. D. Drevelle, Nicolas, P. Bremond et Jérôme Bibette. 2014. Procédé de fusion ou de mise en contact de gouttelettes de réacteur et de réactif dans un dispositif microfluidique ou millifluidique. Patent WO2016020414A1.
- [37] Garstecki, Piotr, Michael J. Fuerstman, Howard A. Stone et George M. Whitesides. 2008. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction – scaling and mechanism of breaking-up. *Lab on a Chip*, 6 (3), 437-446.
- [38] Good, Benjamin H., Michael J. McDonald, Jeffrey E. Barrick, Richard Lenski et Michael M. Desai. 2017. The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations. *Nature*, 551, 45-50. DOI: 10.1038/nature24287.
- [39] Green, Michael H. L., Wendy J. Muriel et Bryn A. Bridges. 1976. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 38 (1), 32-42. DOI: 10.1016/0165-1161(76)90077-7.
- [40] Guo, Mira T., Assaf Rotem, John A Heyman et David A. Weitz. 2012. Droplet microfluidic for high-throughput biological assays. *Lab on a Chip*, 12, 2146-2155. DOI: 10.1039/c2lc21147e.
- [41] Hanski, Ilkka, Atte Moilanen et Mats Gyllenberg. 1996. Minimum viable metapopulation size. *The American Naturalist*, 147 (4), 527-541. DOI: 10.1086/285864.

- [42] Hanski, Ilkka. 2001. Spatially realistic theory of metapopulation ecology. *Naturwissenschaften*, 88 (9), 372-381. DOI: 10.1007/s001140100246.
- [43] Harms, Alexander, Etienne Maisonneuve et Kenn Gerdes. 2016. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 354 (6318), 1-9. DOI: 10.1126/science.aaf4268.
- [44] Hatakeyama, Takuji, Delai L. Chen et Rustem F. Ismagilov. 2005. Microgram-scale testing of reaction conditions in solution using nanoliter plugs in microfluidics with detection by MALDI-MS. *Journal of the American Chemical Society*, 128 (8), 2518-2519. DOI: 10.1021/ja057720w.
- [45] Hegreness, Matthew, Noam Shores, Daniel Hartl et Roy Kishony. 2006. An equivalence principle for the incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science*, 311 (5767), 1615-1617. DOI: 10.1126/science.1122469.
- [46] Hodges, S. R., O. E. Jensen et J. M. Rallison. 2004. The motion of a viscous drop through a cylindrical tube. *Journal of Fluid Mechanics*, 501, 279-301. DOI: 10.1017/S0022112003007213.
- [47] Hoelzel, A. Rus, John Halley, Stephen J. O'Brien, Claudio Campagna, T. Arnborn, Burney J. Le Boeuf, Katherine Ralls et Gabriel A. Dover. 1993. Elephant seal genetic Variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 84 (6), 443-449. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111370.
- [48] Holmes, David et Shady Gawad. 2010. The application of microfluidics in biology. Microengineering in Biotechnology, 55-80. Methods in Molecular Biology. *Humana Press*. ISBN : 978-1-58829-381-7.
- [49] Hurlbert, Stuart H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52 (4), 577-586. DOI: 10.2307/1934145.
- [50] Illing, Rico, Corrina Burkart, Daniel Pfitzner et Dirk Jungmann. 2016. Ecotoxicity assessment using ciliate cells in millifluidic droplets. *Biomicrofluidics*, 10, 1-10. DOI: 10.1063/1.4944869.
- [51] Jacob, Eshel Ben, Israella Becker, Yoash Shapira et Herbert Levine. 2004. Bacterial linguistic communication and social intelligence. *TRENDS in Microbiology*, 12 (8), 366-372. DOI: 10.1016/j.tim.2004.06.006.
- [52] Jakiela, Slawomir, Tomasz S. Kaminski, Olgierd Cybulski, Douglas B. Weibel et Piotr Garstecki. 2013. Bacterial growth and adaptation in microdroplet chemostats. *Angewandte Chemie International Edition*, 52 (34), 8908-8911. DOI: 10.1002/anie.201301524.
- [53] Kreutzer, Michiel T., Freek Kapteijn et Jacob A. Moulijn. 2005. Inertial and interfacial effects on pressure drop of Taylor flow in capillaries. *American Institut of Chemical Engineers Journal*, 51 (9), 2428-2440. DOI: 10.1002/aic.10495.
- [54] Leo, Albert, Corwin Hansch et David Elkins. 1971. Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*, 71 (6), 525-616.
- [55] Lemal, David M. 2004. Perspective on fluorocarbon chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, 69 (1), 1-11. DOI: 10.1021/jo0302556.
- [56] Lenski, Richard E., Michael R. Rose, Suzanne C. Simpson et Scott C. Tadler. 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I Adaptation and divergence during 2,000 generations. *The American Naturalist*, 138 (6), 1315-1341. DOI: 10.1086/285289.

- [57] Lewis, James A. et John T. Fleming. 1995. Chapter 1 Basic culture methods. *Methods in Cell Biology*, 48, 3-29. DOI:10.1016/S0091-679X(08)61381-3.
- [58] Li, Liang, James Q. Boedicker et Rustem F. Ismagilov. 2007. Using a multijunction microfluidic device to inject substrate into an array of preformed plugs without cross-contamination: comparing theory and experiments. *Analytical Chemistry*, 79 (7), 2756-2761. DOI: 10.1021/ac062179n.
- [59] Lobry, J. R., G. Carret et J. P. Flandrois. 1992. Maintenance requirements of *Escherichia coli* ATCC 25922 in the presence of sub-inhibitory concentrations of various antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29 (2), 121-127. DOI: 10.1093/29.2.121.
- [60] Lorber, Nicolas, Flavie Sarrazin, Pierre Guillot, Pascal Panizza, Annie Colin, Bertrand Pavageau, Cindy Hany, Patrick Maestro, Samuel Marre, Thomas Delclos, Cyril Aymonier, Pascale Subra, Laurent Prat, Christophe Gourdone et Emmanuel Mignard. 2011. Some recent advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process: Applications in chemistry and high-pressure microflows. *Lab on a Chip*, 11, 779-787. DOI: 10.1039/c0lc00058b.
- [61] Luria, Salvador E. et Max Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics Society of America*.
- [62] Lutz, Rolf et Hermann Bujard. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 25 (6), 1203-1210. DOI: 10.1093/nar/25.6.1203.
- [63] Marlière, Philippe et Rupert Mutzel. 1998. Method and device for selecting accelerated proliferation of living cells in suspension. Patent US6686194B1
- [64] Marlière, Philippe, Julien Patrouix, Volker Döring, Piet Herdewijn, Sabine Tricot, Stéphane Cruveiller, Madeleine Bouzon et Rupert Mutzel. 2011. Chemical Evolution of a Bacterium's Genome. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 1-7. DOI: 10.1002/anie.201100535.
- [65] Martin, Karin, Thomas Henkel, Volker Baier, Andreas Godrian, Thore Schön, Martin Roth, Johann Michael Köhler et Josef Metze. 2003. Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab on a Chip*, 3, 202-207. DOI: 10.1039/B301258C.
- [66] Matrosovich, Mikhail, Tatyana Matrosovich, Wolfgang Garten et Hans-Dieter Klenk. 2006. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology Journal*, 3 (63). DOI: 10.1186/1743-422X-3-63.
- [67] Mayr, Ernst. 1983. How to carry out the adaptationist program? *The American Naturalist*, 121 (3), 324-334. DOI: 10.1086/284064.
- [68] Montville. R. et D. Schaffner. 2003. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7188-7193. DOI: 10.1128/AEM.69.12.7188-7193.2003.
- [69] Nevo, Eviatar. 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. . *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 98 (11), 6233-6240. DOI: 10.1073/pnas.101109298..

- [70] Oz, Tugce, Aysegul Guvenek, Sadik Yildiz, Enes Karaboga, Yusuf Talha Tamer, Nirva Mumcuyan, Vedat Burak Ozan, Gizem Hazal Senturk, Murat Cokol, Pamela Yeh et Erdal Toprak. 2014. Strength of selection pressure is an important contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 31 (9), 2387-2401. DOI: 10.1093/molbev/msu191.
- [71] Peters, Joseph E., Timothy E. Thate et Nancy L. Craig. 2003. Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *Journal of Bacteriology*, 200 (9), 2017-2021. DOI: 10.1128/JB.185.6.2017-2021.2003.
- [72] Provine, William B. 2004. Ernst Mayr Genetics and speciation. *Genetics*, 167 (3), 1041-1046.
- [73] Robinson, D. Ashley, Edward J Feil et Daniel Falush. 2010. Bacterial Population Genetics in Infectious Disease. Wiley-Blackwell, chapitre I. ISBN: 0470424745.
- [74] Roller, Benjamin RK et Thomas M Schmidt. 2015. The physiology and ecological implications of efficient growth. *The ISME Journal*, 9, 1481-1487. DOI: 10.1038/ismej.2014.235.
- [75] Rozen, Daniel E. et Richard E. Lenski. 2000. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of balanced polymorphism. *The American Naturalist*, 155 (1), 24-35. DOI: 10.1086/303299.
- [76] Růžička, J. et E. H. Hansen. 1975. Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 78 (1), 145-157. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)84761-9.
- [77] Sáenz Yolanda, Myriam Zarazaga, Laura Briñas, Marta Lantero, Fernanda Ruiz-Larrea, et Carmen Torres. 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Journal of antimicrobial agents*, 18 (4), 353-358. DOI: 10.1016/S0924-8579(01)00422-8.
- [78] Salverda, Merijn L. M., Eynat Dellus, Florian A. Gorter, Alfons J. M. Debets, John van der Oost, Rolf F. Hoekstra, Dan S. Tawfik et J. Arjan G. M. de Visser. 2011. Initial mutations direct alternative pathways of protein evolution. *PLOS Genetics*, 7 (3). DOI: 10.1371/journal.pgen.1001321.
- [79] Sanadi, Ashok Ramesh. 1998. Apparatus for preventing cross-contamination of multi-well test plate. Patent US5741463A.
- [80] Sarton, George. 1927. Introduction to the History of Science, Volume I. *Baltimore: Williams & Wilkins*.
- [81] Scherf, Beate D. 2000. World watch list for domestic animal diversity. *Food and Agriculture Organization (FAO)*. ISBN : 9251045119.
- [82] Schmit, Alexandre, Laurent Courbin, Mélanie Marquis, Denis Renard et Pascal Panizza. 2014. A pendant drop method for the production of calibrated double emulsions and emulsion gels. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4, 28504-28510. DOI: 10.1039/C4RA02464H.
- [83] Shimomura, Osamu, Frank H. Johnson et Yo Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular Physiology*, 59 (3), 223-239. DOI: 10.1002/jcp.1030590302.

- [84] Small, P. M., N. B. McClenny, S. P. Singh, G. K. Schoolnik, L. S. Tompkins et P. A. Mickelsen. 1993. Molecular strain typing of mycobacterium tuberculosis to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (7), 1677-1682.
- [85] Strunk, Günther et Tobias Ederhof. 1997. Machines for automated evolution experiments *in vitro* based on the serial-transfer concept. *Biophysical Chemistry*, 66, 193-202. DOI: 10.1016/S0301-4622(97)00062-8.
- [86] Tan, Yung-Chieh, Jeffrey S. Fisher, Alan I. Lee, Vittorio Cristini et Abraham Phillip Lee. 2004. Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab Chip*, 4, 292-298. DOI: 10.1039/B403280M
- [87] Tan, Yung-Chieh, Vittorio Cristini et Abraham P. Lee. 2006. Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device. *Sensor and Actuators B : Chemical*, 114 (1), 350-356. DOI: 10.1016/j.snb.2005.06.008.
- [88] Tawfik, Dan S. et Andrew D. Griffiths. 1998. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*, 16, 652-656. DOI : 10.1038/nbt0798-652.
- [89] Templeton, Alan R. 1980. The theory of speciation *via* the founder principle. *Genetics*, 94 (4), 1011-1038.
- [90] The Bovine HapMap Consortium. 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*, 324 (5926), 528-532. DOI: 10.1126/science.1167936.
- [91] Tjahjadi, Mahari, Howard A. Stone et Julio M. Ottino. 1992. Satellite and subsatellite formation in capillary breakup. *Journal of Fluid Mechanics*, 243, 297-317. DOI: 10.1017/S0022112092002738.
- [92] Tombal, Dominique. 1993. Le polygénisme aux XVIIe et XVIIIe siècles : de la critique biblique à l'idéologie raciste. *Revue belge de Philologie et d'Histoire*, Année 1993, 71 (4), 850-874.
- [93] Tsien, Roger Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509-544. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- [94] Udelwu, Klas I., Nicholas Parrish, Peter Ankomah, Fernando Baquero et Bruce R. Levin. 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (4), 745-757. DOI: 10.1093/jac/dkn554.
- [95] Unger, Marc A., Hou-Pu Chou, Todd Thorsen, Axel Scherer et Stephen R. Quake. 2000. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288 (5463), 113-116. DOI: 10.1126/science.288.5463.113.
- [96] Wang, K., Y. Lu, K. Qin, G. Luo et T. Wang. 2013. Generating gas-liquid-liquid three-phase microflows in a cross-junction microchannel device. *Chemical Engineering Technology*, 36 (6), 1047-1060. DOI: 10.1002/ceat.201200561.
- [97] Wright, Gerard D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 175-186. DOI: 10.1038/nrmicro1614.
- [98] Wright, Sewall. 1982. The shifting balance theory and macroevolution. *Annual review of genetics*, 16, 1-20.

- [99] Yang, Chun-Guang, Zhang-Run Xu et Jian-Hua Wang. 2010. Manipulation of droplets in microfluidic systems. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2), 141-157. DOI: 10.1016/j.trac.2009.11.002.
- [100] Zhang, Xiaoguang et Osman A. Basaran. 1995. An experimental study of dynamics of drop formation. *Physics of Fluids*, 7, 1184-1203. DOI : 10.1063/1.868577.
- [101] Zhang, Xiaoguang, Russel S. Padgett et Osman A. Basaran. 1996. Nonlinear deformation and breakup of stretching liquid bridges. *Journal of Fluid Mechanics*, 329, 207-245. DOI: 10.1017/S0022112096008907
- [102] Zhang, Xiaoguang. 1999. Dynamic of drop formation in viscous flows. *Chemical Engineering Science*, 54, 1759-1774. DOI: 10.1016/S0009-2509(99)00027-5.
- [103] Zheng, Bo et Rustem F. Ismagilov. 2005. A microfluidic approach for screening submicroliter volumes against multiple reagents by using preformed arrays of nanoliter plugs in a three-phase liquid/liquid/gas flow. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 2520-2523. DOI : 10.1002/anie.200462857.