



HAL
open science

Plateforme microfluidique de lyse, tri et détection : vers un diagnostic rapide de la septicémie.

Choayb Omar

► To cite this version:

Choayb Omar. Plateforme microfluidique de lyse, tri et détection : vers un diagnostic rapide de la septicémie.. Physique [physics]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPAST007 . tel-03989307

HAL Id: tel-03989307

<https://theses.hal.science/tel-03989307>

Submitted on 14 Feb 2023

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

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

Plateforme microfluidique de lyse, tri et détection : vers un diagnostic rapide de la septicémie

*Microfluidic platform for lysis, sorting and detection: towards a rapid diagnosis of
sepsis*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 575 electrical, optical bio: physics and engineering (EOBE)

Spécialité de doctorat : Physique

Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée au **Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (CNRS, Université Paris-Saclay)** sous la direction de **Isabelle LE POTIER**, Maître de conférences Université Paris-Saclay, et co-encadrée par **Anne-Marie HAGHIRI GOSNET**, Directrice de recherches CNRS et **Jean GAMBY**, Chargé de recherches CNRS.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 25 Janvier 2023, par

Choayb OMAR

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Bruno LE PIOUFLE

Professeur,
ENS, Palaiseau

Président

Benoit CHARLOT

Directeur de recherches,
IES (UMR5214), Montpellier

Rapporteur & Examineur

Yong CHEN

Directeur de recherches,
ENS (UMR8640), Paris

Rapporteur & Examineur

Gaëlle LISSORGUES

Professeure,
ESIEE, Paris

Examinatrice

Titre : Plateforme microfluidique de lyse, de tri et de détection : vers un diagnostic rapide de la septicémie.

Mots clés : Microfluidique, Electrochimie, Microfabrication, Lyse du sang, Tri des bactéries, Microfluidique inertielle, Détection d'ADN sur puce, Calcul numérique

Résumé : L'incidence de la septicémie est en augmentation et la mortalité des cas sévères est toujours majeure. L'antibiothérapie ne peut être adaptée qu'après 2 à 3 jours après le début du sepsis, car les résultats complets d'hémocultures positives comprenant la primoculture, l'identification et l'antibiogramme nécessitent en général de 24h à 72h après le début de la septicémie. Être capable de détecter et caractériser l'agent pathogène directement dans l'échantillon de sang pour pouvoir administrer un traitement antibiotique adapté dans les heures qui suivent le début du sepsis est donc un enjeu très actuel. Le but de mon doctorat était de développer une plateforme microfluidique multiplexe permettant d'effectuer la détection d'agents pathogènes responsables d'infections sévères et d'étudier leur résistance aux antibiotiques. Dans ce contexte, afin de faciliter l'extraction des agents pathogènes, nous avons développé un module de lyse qui permet de détruire spécifiquement les cellules sanguines alors que les bactéries restent viables. Nous avons également développé un module de tri pour trier les bactéries parmi les débris sanguins. Avec ce dispositif, nous avons réussi à trier non seulement des particules synthétiques choisies comme modèles (pureté ~ 99%) mais aussi des bactéries (pureté ~ 65%) avec un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un troisième module pour la détection électrochimique multiplexée de plusieurs gènes de résistance a été développé dans cette thèse. Nous avons réussi à détecter un gène de résistance CTXM GP8, d'une vingtaine de paires de bases, en 30 minutes avec une limite de détection de 10^{-16} M, sans amplification PCR.

Title: Microfluidic lysis, sorting and detection platform: towards a rapid diagnosis of sepsis.

Keywords: Microfluidics, Electrochemistry, Microfabrication, Blood lysis, Bacteria sorting, Inertial microfluidic, On-chip DNA detection, Numerical calculations

Abstract: The incidence of sepsis is increasing and the mortality of severe cases is always greater. Antibiotic therapy can only be adapted after 2-3 days after the beginning of sepsis, as complete results of positive blood cultures, including primary culture, identification and antimicrobial susceptibility, typically require 3 days. Being able to detect and characterize the pathogen directly in the blood sample in order to administer a suitable antibiotic treatment after only a few hours is therefore a real challenge. The goal of my PhD was to develop a microfluidic platform capable of detecting multiple pathogens responsible for severe infections and analyzing their resistance to antibiotics. To achieve this, we designed a lysis module that specifically breaks down blood cells while preserving the viability of bacteria. We also created a sorting module to separate the bacteria from the blood debris with high purity (approximately 99% for particles and 65% for bacteria) at a flow rate of 600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Lastly, we developed a module for multiplexed electrochemical detection of various resistance genes. We successfully detected the CTXM GP8 resistance gene, which is 20 base pairs long, within 30 minutes with a detection limit of 10^{-16} M without PCR amplification.

Table des matières

Table des matières	3
Remerciements.....	7
Liste des abréviations	9
Introduction générale	10
Chapitre 1 – Septicémie et microfluidique : état de l’art	14
1 La septicémie	15
1.1 Définitions et épidémiologie.....	15
1.2 Principales caractéristiques du sang humain.....	16
1.3 Anatomie-structure et physiologie de la bactérie.....	17
1.4 Méthodes actuelles de diagnostic de la septicémie.....	19
2 Etat de l’art sur les techniques conventionnelles de tri et de séparation des cellules	20
2.1 Méthodes classiques d’extraction.....	21
2.1.1 Méthodes sans marqueur	22
2.1.2 Méthodes immunologiques	24
3 Intérêt de la microfluidique.....	26
3.1 Loi d’écoulement de flux dans des microcanaux fluidiques.....	26
3.2 Résistance fluide.....	28
3.3 Diffusion et mélange : Nombre de Peclet.....	30
4 Etat de l’art sur les techniques microfluidiques pour l’isolement des cellules et de microparticules	31
4.1 Isolement des cellules par les approches physiques.....	32
4.1.1 Acoustophorèse	32
4.1.2 Diélectrophorèse	33
4.1.3 Magnétophorèse.....	35
4.1.4 Microfluidique inertielle.....	36
4.2 Déplétion des cellules sanguines par lyse chimique et/ou choc osmotique	53
4.2.1 L’osmolarité	54
4.2.2 Mécanismes de lyse des érythrocytes par les agents tensioactifs.....	56
5 Techniques de détection d’ADN en électrochimie	59
5.1 Biocapteur microfluidique pour la détection électrochimique d’acides nucléiques ..	59
5.1.1 Principe de base des biocapteurs électrochimiques à ADN	60
5.2 Méthodes d’immobilisation de la séquence d’ADN sonde.....	61

Chapitre 2 – Procédés de fabrication des dispositifs	64
1 Fabrication du module 1 : dédié à l'extraction des bactéries du sang	65
1.1 Réalisation des moules par photolithographie	65
1.1.1 Caractérisation des moules fabriqués	70
1.2 Fabrication des dispositifs en PDMS	72
1.3 Collage des dispositifs	74
1.3.1 Collage humide PDMS/hexane	74
1.3.2 Collage de type plasma oxygène	75
2 Fabrication du module 2 : dédié à la détection électrochimique d'ADN	77
2.1 Réalisation des électrodes par photolithographie.....	77
2.2 Métallisation et lift-off des électrodes	79
3 Mise en place des connectiques fluidiques	81
Chapitre 3 – Performance du module de lyse : méthodes et mesures.....	82
1 Détermination du pouvoir lytique de la saponine et/ou de l'eau à l'échelle macroscopique sur les cellules sanguines par cytométrie en flux	83
1.1 Principe de la cytométrie en flux.....	83
1.2 Protocole d'incubation et analyse par cytométrie	85
1.2.1 Résultats et discussion.....	87
2 Détermination du pouvoir lytique de la saponine et/ou de l'eau à l'échelle macroscopique sur les bactéries par cytométrie en flux	92
2.1 Protocole de culture bactérienne.....	92
2.2 Préparation des boîtes de culture	92
2.3 Préparation de la suspension bactérienne	93
2.4 Protocole de marquage des bactéries	94
2.5 Dénombrement des bactéries dans une suspension mère	95
2.6 Etude l'effet de la saponine sur la viabilité des bactéries	97
2.7 Effet du choc osmotique sur les bactéries.....	99
3 Optimisation du module de lyse sanguine en microfluidique.....	102
3.1 Préparation des solutions.....	102
3.2 Banc expérimental.....	102
3.3 Designs 1-2.....	103
3.4 Designs 3-4.....	105
3.5 Design 5	106
3.6 Design 6	107
3.7 Design 7 – la géométrie optimale.....	108

3.7.1	Tests fluidiques du circuit mélangeur de la géométrie 7.....	108
3.7.2	Simulation avec le logiciel COMSOL.....	110
3.7.3	La lyse du sang de cheval à l'échelle microscopique.....	112
Chapitre 4 – Performance du module de tri : méthodes et mesures		118
1	Module de tri (Microparticules et bactéries).....	119
1.1	Design.....	119
1.2	Suspension de particules.....	120
1.3	Banc expérimental.....	120
1.4	Résultats et discussions	121
1.4.1	Tests fluidiques, design 1 (h=40 µm).....	121
1.4.2	Tests fluidique, design 2 (h=20 µm).....	133
Chapitre 5 – Performance du module intégré (lyse et tri) : méthodes et mesures.....		137
1	Design	138
2	Préparation des solutions.....	138
3	Résultats et discussions	138
3.1	Lyse des cellules sanguines.....	138
3.2	Tri des particules	139
Chapitre 6 – Performance du module de détection électrochimique : méthodes et mesures		142
1	Module de détection électrochimique	143
1.1	Montage à 2 électrodes.....	143
1.2	Banc expérimental.....	144
1.3	Potentiostat	145
1.4	Séquences des gènes de résistance	145
1.5	Méthode de mesure électrochimique.....	146
2	Immobilisation des ADN sondes sur les microélectrodes en Pt et hybridation des acides nucléiques cibles.....	146
2.1	Immobilisation par voie électrochimique	146
2.1.1	Immobilisation de la séquence sonde	147
2.1.2	Hybridation des brins d'ADN.....	149
2.1.3	Résultats et discussion.....	149
2.1.4	Détection électrochimique du brin complémentaire.....	152

2.1.5	Spécificité de la détection électrochimique	153
2.2	Immobilisation par voie chimique (Pt-Thiol).....	154
2.2.1	Fonctionnalisation de la séquence sonde.....	154
2.2.2	Hybridation de la séquence cible.....	154
2.2.3	Résultats et discussion.....	155
Conclusions et perspectives.....		165
Références		168
Annexes.....		181
Liste des illustrations		192

Remerciements

Mes sincères remerciements s'adressent à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner mes travaux de thèse : M. Benoit CHARLOT, M. Yong CHEN, M. Bruno LE PIOUFLE et Mme. Gaelle LISSORGUES.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Mme. Isabelle LE POTIER, ma co-encadrante, Mme. Anne-Marie HAGHIRI-GOSNET et mon co-encadrant, M. Jean GAMBY, pour leurs précieux conseils, leurs temps et l'énergie qu'ils m'ont consacrés durant ces années de thèse.

Je souhaite également remercier Mme. Sylvie BOUTTIER pour ses conseils et son aide concernant la partie Bactériologie.

J'adresse mes remerciements à nos collaborateurs hospitaliers, Mme. Emmanuelle CAMBEAU et M. Herve JACQUIER. Je remercie particulièrement M. Hervé JACQUIER pour toutes ses informations complémentaires qui m'ont aidé à comprendre et cerner clairement le contexte du sujet. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa participation au jury de ma thèse.

Je remercie également Abdelmounaim HAROURI et David BOUVILLE pour leur aide, leur transfère de connaissance et compétences pour le travail en salle blanche.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail. Je remercie particulièrement Mehdi El-Gorhi qui m'a beaucoup aidé surtout dans mes dernières manips.

Je remercie tous les membres de l'équipe Biosys et particulièrement Martina FREISA pour tous les moments passés ensemble.

Je réserve ces quelques lignes aux équipes de ressources humaines et plus particulièrement à Lydia ANDALON et Melissa LEGENDRE pour leur aide et leur disponibilité, à Elodie COLIN (Gestionnaire Service Budgets et Finances) et à toute l'équipe SI particulièrement Alain PEAN et Medhi IDOUHAMED.

Ma deuxième famille en France, Abed Al baset, Sara, Sarah, Nour, Chiraz et Teseer, merci pour votre présence, grâce à vous, je ne me suis jamais senti loin de chez moi. Merci également à tous mes amis avec qui j'ai passé d'agréables moments sur Paris (Julia, Zeina, Nour, Mohamed Abdallah et Iyad) et surtout pendant la période de rédaction. Mes amis au Liban notamment Nahed ABDULHAMID, je ne vous ai pas oublié, malgré les longues distances, vous étiez toujours là, je vous adresse un grand merci.

Je remercie également tous mes amis au C2N qui m'ont beaucoup soutenu pendant cette aventure. Je remercie particulièrement Jawad, Shatha, Obaïd, Hassan, Hani, Mohamed, Elias, Hana et Nessrine pour les ondes positives qu'ils m'ont transmises et pour leurs soutien moral (nos pauses café et nos discussions vont me manquer).

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon ami Marek JBAILI et à sa femme Sondos HLAYHEL, avec qui j'ai partagé des moments agréables à Gif Sur Yvette. Je souhaiterais également les remercier pour les délicieux repas qu'ils m'ont préparés durant la rédaction de cette thèse.

Toute ma reconnaissance à mon frère, Souhayb, et mes sœurs, Bayane, Batoul et Borak. Leurs soutiens, tant moral que scientifique, m'a profondément touché. Je profite de l'occasion pour adresser un message d'amour à mes deux anges, mon beau neveu Mohamed et ma belle nièce Arwa, je vous aime Khalo. Je tiens également à remercier mes beaux-frères Amer et Moemen.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers mes parents, Mme Nada AL MASRI et M. Ghazi OMAR. Si je suis là, c'est grâce à vous. Je n'oublierai jamais les sacrifices que vous avez consentis pour me permettre de poursuivre mes études et d'atteindre mes objectifs. Vos conseils, votre patience et votre amour inconditionnel ont été une source de motivation et d'inspiration pour moi. Merci infiniment pour votre soutien indéfectible.

Liste des abréviations

PCR : Polymerase Chain Reaction

ADN : Acide Désoxyribonucléique

UFC : Unité Formant Colonie

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

MACS: Magnetic-activated cell sorting

E. Coli : *Escherichia coli*

HCT : Hématocrite

UV : Ultraviolet

PDMS : Polydiméthylsiloxane

MEB : Microscopie électronique à balayage

HDMS : Hexaméthylidisilazane

FSC : Forward Scatter

SSC : Side Scatter

TSA : Tryptone Soy Agar

IP : Iodure de Propidium

EDI : Eau désionisée

PCB : Printed circuit board

Sulfo SMCC : Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate

NC : Non complémentaire

CV : Cyclic Voltammetry

EIS: Electrochemical Impedance Spectroscopy

MCH: 6-mercapto-1-hexanol

TCEP: Tris(2-carboxyéthyl) phosphine

EDA: Ethylenediamine

ssDNA: ADN sonde

dsDNA: ADN cible

Introduction générale

La septicémie est une maladie grave caractérisée par un état inflammatoire du corps entier provoqué par une infection. Cette infection est due à la pénétration dans l'organisme d'éléments pathogènes et à leur développement incontrôlé. Dans les cas les plus graves, la septicémie peut évoluer jusqu'au choc septique qui peut conduire à la mort, avec une augmentation associée de la mortalité de 7 pour cent pour chaque heure de retard dans l'administration d'antibiotiques appropriés. Or, du fait de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, l'inadéquation du traitement anti-infectieux, empirique ou de première intention, peut aller jusqu'à 20-30 pour cent des cas. L'antibiothérapie ne peut être adaptée qu'après 2 à 3 jours après le début de l'infection, car les méthodes actuelles de diagnostic de la septicémie impliquent des cultures longues de plusieurs jours. Les résultats complets d'hémocultures positives comprenant la primo-culture, l'identification et l'antibiogramme nécessitent en général de 24h à 72h après le début de l'infection. Être capable de détecter et caractériser l'agent pathogène directement dans l'échantillon de sang pour pouvoir administrer un traitement antibiotique adapté dans les heures qui suivent le début de l'infection est donc un enjeu très actuel.

Malgré le progrès des tests génétiques, dont la PCR multiplex miniaturisée utilisée dans de nombreux tests commercialisés, il reste un grand nombre de facteurs limitants, dont :

- le manque de sensibilité des tests de PCR, du fait de l'impossibilité de traiter un volume d'échantillon supérieur à 1 mL, alors que les hémocultures permettent d'avoir une culture bactérienne positive à partir de 30 à 40 mL de sang.
- la difficulté de détecter la grande diversité des bactéries responsables d'infections sévères par un seul test. En effet, des tests ciblant une bactérie précise existent, mais seulement pour quelques bactéries (staphylocoque, pneumocoque, ...). Il faut alors répéter autant de tests que de bactéries recherchées.
- les gènes de résistance aux antibiotiques sont tellement nombreux que les rares tests existants ciblent seulement un ou deux gènes (mecA pour la résistance des staphylocoques à la pénicilline, vanA pour la résistance aux glycopeptides, kpc pour certaine résistance aux carbapénèmes).
- les rares tests qui existent pour la détection moléculaire multiplexe de pathogènes dans le sang donnent le résultat d'identification, mais pas d'information sur la

résistance aux antibiotiques, ce qui ne permet pas d'adapter le traitement antibiotique empirique.

Si les résultats de positivité, d'identification des pathogènes et de leur résistance aux antibiotiques étaient obtenus dans les heures qui suivent le début du sepsis, le traitement pourrait être adapté plus rapidement et impacterait sur la mortalité.

L'objectif majeur de mon projet doctoral était donc de développer un nouveau test rapide, constitué d'une plateforme microfluidique intégrée, permettant l'extraction et la détection des pathogènes responsables d'infections sévères, tout en renseignant sur leur résistance aux antibiotiques.

Sur la base d'études bibliographiques, nous avons cherché à proposer une stratégie microfluidique innovante permettant de traiter très rapidement un volume élevé de quelques dizaines de millilitres de sang infecté. La plateforme fluidique comprend deux modules indépendants permettant, i) d'extraire les agents pathogènes (bactéries) présents dans le sang de patients atteints d'infections, et ii) de réaliser une analyse génomique de l'ADN bactérien avec une identification moléculaire par détection électrochimique sensible et directe sans amplification PCR.

Le premier module (appelé module intégré ou module 1), dédié à l'extraction des micro-organismes du sang, est constitué de deux parties :

- la première partie (**appelé module de lyse**) doit permettre de lyser complètement les cellules sanguines tout en maintenant viables les micro-organismes de manière à les extraire sans les endommager.
- une deuxième partie (**appelé module de tri**) doit permettre de trier ces micro-organismes parmi les débris sanguins de manière à obtenir une solution contenant principalement les bactéries.

Chaque partie a été développée indépendamment, avant de coupler les deux ensemble et obtenir ainsi un module intégré (module de lyse + tri).

La lyse des bactéries est ensuite réalisée à l'échelle macroscopique, avant la dernière étape qui consiste à analyser l'ADN génomique extrait de la bactérie, par détection électrochimique sensible et directe. Cette dernière étape est réalisée dans **le deuxième module** microfluidique (**appelé module de détection électrochimique ou module 2**) en utilisant un greffage de sondes spécifiques de la résistance aux antibiotiques.

Dans ma thèse, j'ai mené en parallèle et pas successivement le développement des quatre modules : module de lyse, module de tri, module intégré (lyse et tri) et module de la détection électrochimique (figure I.1). En conséquence, mes résultats ne suivent pas une chronologie historique.

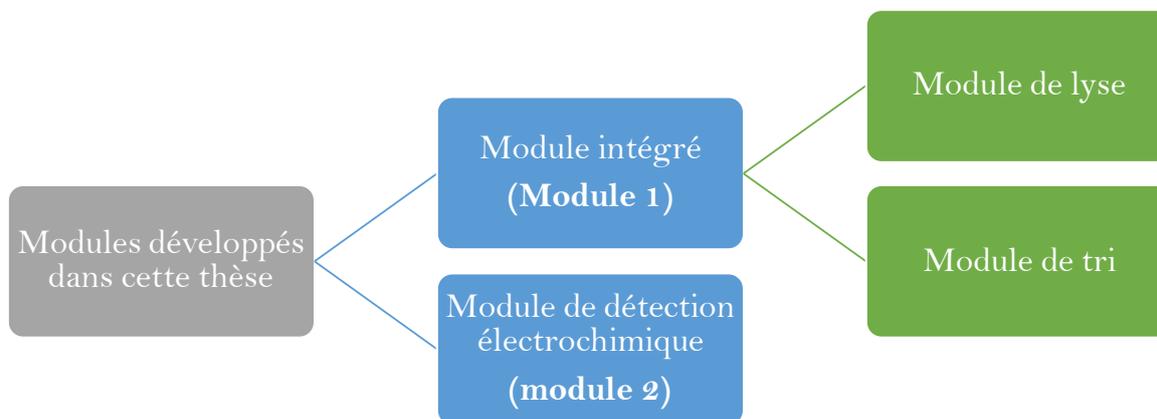


Figure I. 1 Modules développés dans cette thèse.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente l'étude bibliographique que j'ai réalisée au cours ma thèse. La première partie de ce chapitre introductif présente le contexte général, en donnant, d'abord les caractéristiques de la septicémie, puis celles du sang humain et des bactéries ainsi que les définitions importantes. Cette première partie s'achève avec la description des méthodes actuelles de diagnostic de la septicémie qui consistent à extraire et cultiver les micro-organismes à partir d'un échantillon de sang infecté. Ce chapitre se poursuit avec une deuxième partie décrivant les techniques conventionnelles de tri et de séparation des cellules/bactéries, et une troisième partie où l'on montre pourquoi la microfluidique présente un grand intérêt en termes de rapidité et de volume traité, et où l'on décrit les différentes méthodes d'isolement d'agents pathogènes. La stratégie que nous avons sélectionnée pour concevoir une puce permettant d'isoler rapidement les bactéries d'un échantillon sanguin est ensuite présentée. Ce chapitre s'achève enfin avec une quatrième partie, qui présente l'état de l'art des méthodes de détection électrochimique sensible et directe de l'ADN sans amplification PCR au sein de microsystèmes microfluidiques. Les différentes méthodes d'immobilisation d'ADN sont aussi décrites dans cette partie.

Le deuxième chapitre présente les procédures de la fabrication des dispositifs microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS), basées principalement sur la lithographie aux UV, soit dans

une résine épaisse (SU8) pour l'obtention de moules, soit dans une résine fine pour l'obtention d'électrodes métalliques de détection. Les puces en PDMS sont obtenues par moulage et collage.

Le troisième chapitre présente les travaux expérimentaux que j'ai réalisés autour de la lyse du sang. Dans un premier temps, les tests de lyse sanguine réalisés à l'échelle macroscopique sont décrits et permettent d'envisager un protocole optimal de lyse en deux étapes (lyse par réaction avec un détergent suivie d'un choc osmotique). La deuxième partie de ce chapitre décrit la mise au point du design de la plateforme fluidique qui vise à maximiser le débit tout en optimisant les mélanges (**module de lyse**). Les résultats des tests fluidiques qui ont été effectués avec des colorants sur différentes configurations de puce sont présentés. Ce chapitre s'achève avec l'expérience de lyse du sang optimisée dans la puce fluidique.

Le quatrième chapitre présente les résultats expérimentaux des tests de tri des particules et bactéries dans le **module de tri**. De manière similaire, le choix du débit optimal est effectué d'après des expériences avec des solutions de particules synthétiques. Le rôle de la hauteur du canal fluidique sur l'efficacité du tri est discuté. Ce chapitre s'achève avec l'expérience de tri sur des solutions bactériennes d'*E. Coli*.

Le cinquième chapitre traite de la plateforme fluidique qui intègre les deux modules de lyse et de tri (**module intégré**). Cette plateforme au design optimisé, composée de deux modules permet de réaliser, dans une même puce, la lyse des cellules sanguines pour faciliter l'extraction de micro-organismes, puis de trier ces micro-organismes parmi les débris sanguins.

Le sixième chapitre présente les résultats des tests de détection électrochimique qui ont été effectués dans des puces de détection (**module de détection électrochimique**) intégrant des électrodes métalliques fonctionnalisées pour y greffer une sonde oligonucléotide spécifique de la résistance aux antibiotiques. Ce chapitre compare deux méthodes de greffage différentes et rapporte des résultats de détection en termes de spécificité et de sensibilité.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion sur les travaux effectués et sur les perspectives envisagées.

Chapitre 1 – Septicémie et microfluidique : état de l'art

Le chapitre 1 présente le contexte général de ces travaux. Les définitions et les caractéristiques de la septicémie, du sang humain et des bactéries, ainsi que l'état de l'art sur les méthodes actuelles de diagnostic de la septicémie sont présentées dans un premier temps. Une étude bibliographique sur les techniques conventionnelles de tri et de séparation des cellules est présentée dans un second temps. La partie 3 présente l'intérêt de la microfluidique et son utilisation dans l'isolement des cellules et microparticules. Enfin, la dernière partie est consacrée à la présentation des méthodes de détection électrochimique sensible et directe de l'ADN.

1 La septicémie

1.1 Définitions et épidémiologie

La septicémie est une infection généralisée de l'organisme d'origine bactérienne qui provoque une importante réponse inflammatoire. Le terme de septicémie peut être remplacé par celui de « bactériémie associée à un sepsis ». La bactériémie se définit par la présence de bactéries dans la circulation sanguine. A la suite d'une blessure ou d'une certaine perméabilité des parois de l'intestin dans certaines conditions, le sang circulant peut être contaminé par des bactéries. La plupart du temps, ces contaminations sont maîtrisées par le système immunitaire et aucun symptôme n'est décelé. Il arrive cependant parfois que la réponse immunitaire de l'organisme soit défaillante, la quantité de bactéries dans le sang augmente alors considérablement et conduit à la septicémie. La plupart du temps, le pathogène provient d'un foyer infectieux déjà existant (infection pulmonaire, urinaire ou digestive) mais l'infection peut être aussi liée à la pose de cathéters vasculaires ou de sondes urinaires, digestives ou d'intubation trachéale en milieu hospitalier. Le sepsis est une réaction inflammatoire généralisée excessive en réponse à l'infection grave. Il est défini par une dysfonction d'organes menaçant le pronostic vital et causée par une réponse inappropriée de l'hôte à l'infection [1]. La septicémie peut mener dans les cas les plus graves à un choc septique [2], avec des anomalies importantes circulatoires et métaboliques, qui est potentiellement mortel en quelques heures. La septicémie est un des premiers enjeux de la santé publique dans les pays développés, près de 1,2 millions de cas étant recensés chaque année en Europe. Elle se situe parmi les sept premières causes de décès en Europe et en Amérique du nord. En 2013, 157 000 décès dues à la septicémie ont été répertoriés en Europe [3].

La survie des patients est étroitement liée à la mise en place le plus rapidement possible d'un traitement antibiotique adapté permettant la suppression de l'origine de la septicémie. Il a été démontré que la mortalité augmente dès la première heure de retard d'un traitement antibiotique adéquat [4]. En 2014, Zilbergerg et al ont montré que la multi-résistance aux antibiotiques est fortement associée à la mise en place d'un traitement inadapté de première intention [5].

Toutes les bactéries peuvent être en cause, y compris celles qui ne sont pas pathogènes et dont l'organisme est habituellement porteur au niveau de la peau, des voies respiratoires ou du tube digestif par exemple. Environ 90 pour cent des micro-organismes à l'origine de l'infection sont des bactéries, les champignons peuvent également, mais plus rarement, être impliqués.

1.2 Principales caractéristiques du sang humain

Le sang est un fluide biologique qui circule continuellement dans les vaisseaux sanguins et le cœur. Il permet la diffusion du dioxygène, des éléments nutritifs et protéines nécessaires aux processus vitaux des organes et tissus de l'organisme ainsi que le transport du dioxyde de carbone et des déchets azotés vers les organes susceptibles de les éliminer (reins, poumons, foie, intestin). Il est composé à 55 pour cent de plasma et à 45 pour cent de cellules (érythrocytes, leucocytes et thrombocytes) ayant des grandes disparités en concentration et en taille (cf. figure 1.1 et tableau 1.1 suivants) [6].

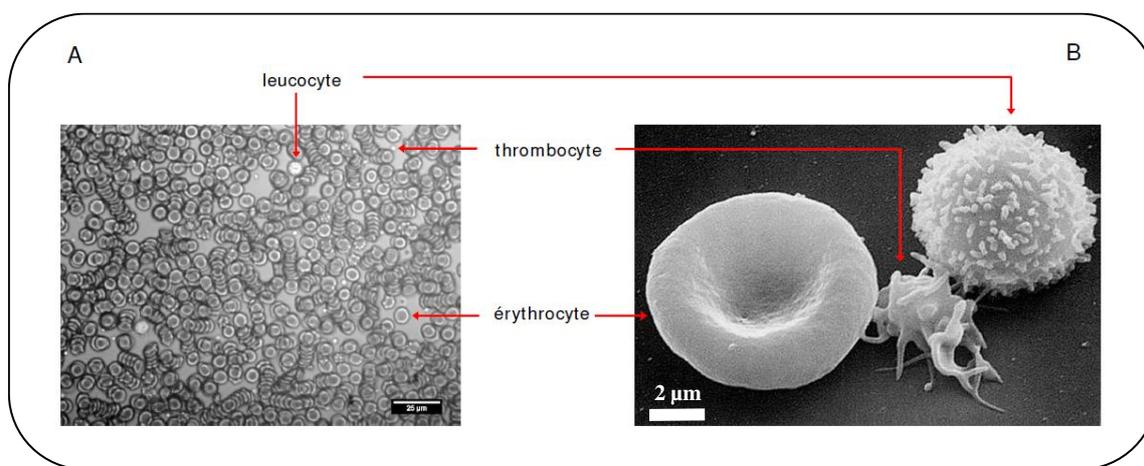


Figure 1. 1 Illustrations de cellules sanguines observées au microscope optique entre lame et lamelle (A) et au microscope électronique à balayage (B) [6]

type cellulaire	forme	taille	concentration dans le sang
thrombocyte (plaquette)	forme irrégulière	3 μm	1,5-4,5 $10^8/\text{mL}$
leucocyte (globule blanc)	généralement sphérique	5-20 μm	5-7 $10^6/\text{mL}$
érythrocyte (globule rouge)	disque biconcave	$\text{Ø} = 8 \mu\text{m}$	4-6 $10^9/\text{mL}$

Tableau 1. 1 Principales caractéristiques des cellules du sang humain [6].

L'hématocrite (Hct) est par définition une grandeur donnant le pourcentage volumique de globules rouges présents dans le sang. Le sang humain a une Hct moyenne de 45% pour les hommes et de 40% pour les femmes [7], tandis que l'Hct du sang de cheval adulte varie entre 31 et 50% [8]. Il convient de mentionner que nous nous intéressons particulièrement aux paramètres du sang de cheval car c'est avec du sang de cheval que nous réalisons les tests de lyse, présentés au chapitre 3.

Décrivons ci-dessous brièvement la structure de la membrane cellulaire des globules rouges et des globules blancs. La membrane plasmique est la membrane qui délimite une cellule en

séparant l'intérieur de la cellule (le cytoplasme) du milieu extérieur. Elle est majoritairement composée de phospholipides disposés en double couche, entre lesquels des protéines peuvent s'insérer (voir figure 1.2). Les phospholipides sont décomposés en deux parties : une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Dans les milieux aqueux, les phospholipides s'organisent naturellement en bicouches phospholipidiques, les queues hydrophobes destinées vers l'intérieur de la bicouche et les têtes hydrophiles vers les milieux aqueux intracellulaires et extracellulaires [9].

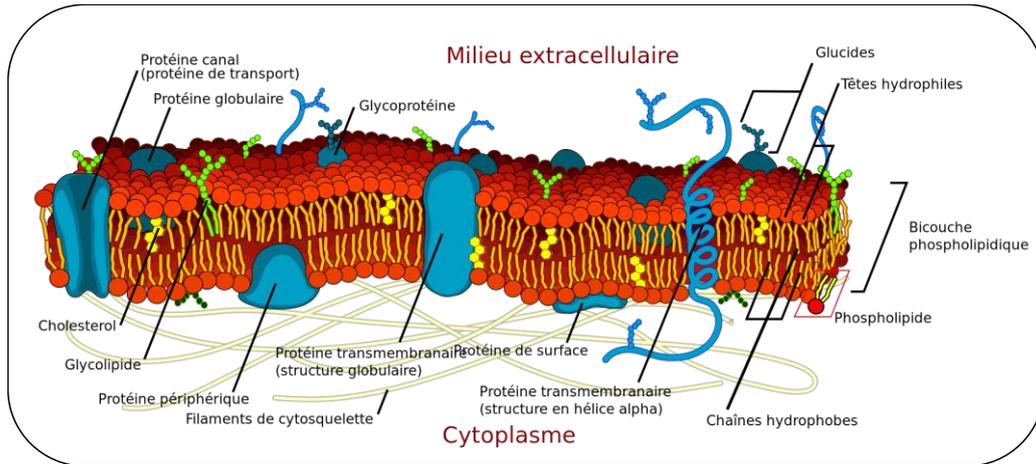


Figure 1. 2 Composition de la membrane cytoplasmique. Schéma provenant de l'article Membrane (biologie) de Wikipédia [10].

1.3 Anatomie-structure et physiologie de la bactérie

Les bactéries sont des organismes unicellulaires et sans noyau (on parle d'organismes procaryotes). Leur génome est constitué d'un unique chromosome circulaire. Le cytoplasme peut aussi contenir des plasmides, qui sont des molécules d'ADN circulaires extra-chromosomiques que les bactéries peuvent s'échanger rapidement (voir figure 1.3A).

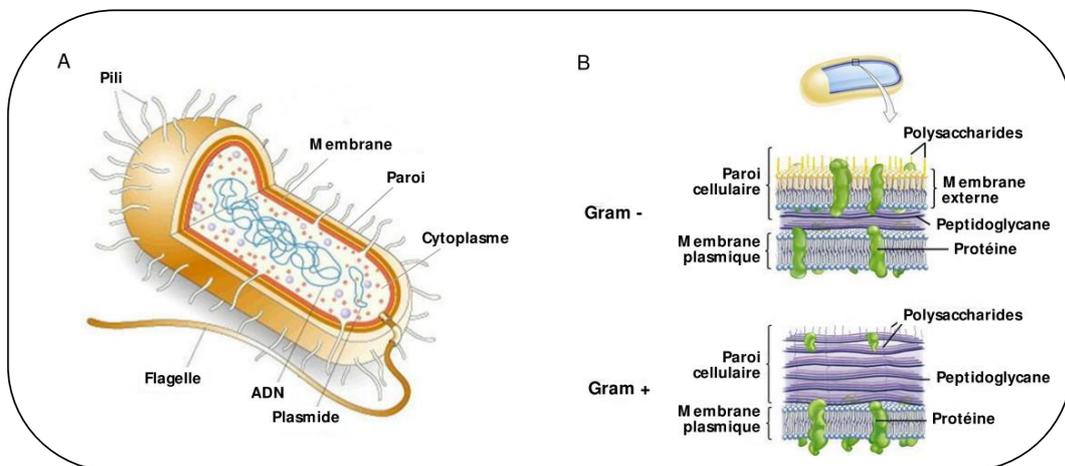


Figure 1. 3 A) Schéma d'une bactérie [6], B) structure des parois bactériennes Gram + et Gram - [11].

Ils peuvent coder pour des toxines ou des enzymes ayant un rôle dans certains mécanismes de résistance aux antibiotiques. La taille d'une bactérie est comprise en général entre 1 et 10 μm , son poids est d'environ 10^{-12} g, elle contient 70 % d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines, de lipides, de lipopolysaccharides, de peptidoglycane, de ribosomes, d'ARN et d'ADN [12].

Les bactéries peuvent être de différentes formes (coques, bacilles, etc...) [13]. La taille et la forme d'une bactérie sont définies par la paroi externe rigide qui se trouve autour de l'organisme unicellulaire. Elle agit également comme une barrière protectrice vis-à-vis du milieu extérieur, permettant notamment aux bactéries de résister au choc osmotique. On distingue deux grands groupes de bactéries en fonction de la composition de leur paroi (voir figure 1.3B) :

- **Les bactéries Gram+** ont une paroi composée de 2 éléments principaux : une paroi épaisse de peptidoglycane et une membrane plasmique, le peptidoglycane est le constituant majeur (90 pour cent des constituants de la paroi). Elles sont chargées négativement.
- **Les bactéries Gram-** possèdent également une membrane plasmique, mais le peptidoglycane est une couche mince qui ne représente que 5 à 20 pour cent des constituants de la paroi bactérienne et entourée par une membrane externe.

Tous les micro-organismes qui existent dans le corps humain ne sont pas pathogènes. Ils sont même particulièrement utiles pour le bon fonctionnement du corps humain, comme la flore intestinale. *Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie Gram- naturellement présente dans notre tube digestif, c'est l'espèce bactérienne la plus souvent responsable des bactériémies et dont la résistance aux antibiotiques est en augmentation ces dernières années. Elle est inoffensive dans la majorité des cas et ne provoque aucune maladie. C'est une bactérie qui est présente dans la flore intestinale, elle nous protège même contre certaines infections, tout événement susceptible de perturber l'équilibre de cette flore intestinale peut provoquer une diarrhée.

Malheureusement, il existe des souches d'*E. coli* qui sont dangereuses pour l'organisme et peuvent provoquer la septicémie, chacune de ces souches est issue à la base d'une bactérie inoffensive, qui mute de façon spontanée. Le plus souvent, la mutation ne permet pas à la

bactérie de survivre mais il arrive très rarement que cette mutation lui confère un avantage sur les autres bactéries ce qui provoque la perturbation de l'équilibre de la flore. La bactérie mutante se multiplie en laissant la nouvelle propriété pathogène.

On distingue aussi trois catégories de bactéries en fonction de leur besoin ou non d'oxygène pour se développer : les bactéries aérobies strictes nécessitent la présence d'oxygène pour se diviser tandis que les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en l'absence d'oxygène. La 3ème catégorie regroupe les bactéries aéro-anaérobies facultatives qui se développent quelle que soit la concentration en dioxygène.

1.4 Méthodes actuelles de diagnostic de la septicémie

Le diagnostic des infections sanguines présente de nombreux défis, notamment en raison de la faible concentration d'agents pathogènes présents dans le sang périphérique. Chaque millilitre de sang infecté contient environ 4 à 6×10^9 globules rouges, jusqu'à 5 à 7×10^6 globules blancs et $1,5$ à $4,5 \times 10^8$ plaquettes, avec seulement 1 à 100 bactéries [6].

La méthode de référence actuellement utilisée en milieu hospitalier pour le diagnostic de la septicémie consiste à prélever un échantillon sanguin et à procéder à une étape d'hémoculture, qui dure de 24 à 72 h, de façon à augmenter la quantité de micro-organismes pour être en mesure de les détecter (la concentration en bactéries est très faible, de l'ordre de 1 à 100 bactérie/mL). Lorsque l'hémoculture est positive, des tests complémentaires sont effectués afin de déterminer l'identité de l'agent pathogène : examen microscopique, coloration de Gram, isolement sur boîtes de milieux de culture variés et spécifiques de certains pathogènes (18 h à 24 h pour *E. coli*). L'identification complète se fait en effectuant une série de tests biochimiques (besoin en oxygène, capacité à transformer certains réactifs chimiques, ...) en utilisant un automate équipé de plusieurs puits, chacun d'entre eux permettant de révéler un aspect particulier du micro-organisme. Le recoupement des réponses de chacun des puits permet l'identification du micro-organisme. Des tests de sensibilité aux antibiotiques sont réalisés en parallèle en déposant sur le milieu de culture un gradient de concentration d'antibiotiques et en déterminant la valeur de la concentration minimale permettant d'inhiber la croissance des agents pathogènes.

De nouvelles méthodes de détection et d'identification des pathogènes directement dans le prélèvement sanguin sont plus récemment apparues :

- les techniques de biologie moléculaire permettent ainsi la détection et l'identification d'un micro-organisme par reconnaissance de son matériel génétique, elles permettent également de déterminer la présence de gènes de résistance aux antibiotiques. Ces tests moléculaires se font en plusieurs étapes :

- i) lyse du pathogène en recourant à l'utilisation d'ultrasons ou de procédés chimiques ou mécaniques
- ii) extraction et purification des acides nucléiques par utilisation de kits commerciaux à base de billes magnétiques ou de colonnes d'élution
- iii) amplification d'une ou plusieurs séquences d'acides nucléiques par la méthode PCR (polymerase chain reaction)
- iv) identification des acides nucléiques amplifiés par des méthodes de séquençage, par des méthodes d'électrophorèse sur gel ou par spectrométrie de masse.

- les méthodes spectroscopiques fondées sur la composition protéique du pathogène se développent en parallèle : la spectrométrie de masse (technique MALDI-TOF) et la spectroscopie Raman permettent de produire des spectres caractéristiques d'un agent pathogène et de l'identifier par comparaison avec la signature de micro-organismes connus et répertoriés dans des banques de données. Pour des raisons de sensibilité de détection, ces méthodes sont appliquées après une étape de culture de l'échantillon biologique prélevé.

2 Etat de l'art sur les techniques conventionnelles de tri et de séparation des cellules

La préparation de l'échantillon est souvent la première étape critique, soit pour séparer des composants cellulaires, soit pour trier un type de cellule souhaité à partir d'un fluide hétérogène. Traditionnellement, cette tâche est accomplie avec le tri cellulaire activé par fluorescence (FACS : Fluorescence activated cell sorting), ou le tri cellulaire activé magnétiquement (MACS : Magnetic activated cell sorting). Cependant, ces méthodes conventionnelles sont entravées par plusieurs limitations, notamment une instrumentation volumineuse et peu maniable, un faible débit d'échantillons, la mort cellulaire, une capacité de quantification limitée ou des coûts élevés. Ces limites ont incité les chercheurs à rechercher d'autres moyens plus efficaces, et à partir de là, la microtechnologie est considérée comme la solution à ces problèmes [14].

Depuis une dizaine d'années, l'amélioration des techniques de microfabrication a conduit à l'élaboration de microsystèmes fluidiques intégrés. Ces microsystèmes microfluidiques représentent une voie prometteuse dans le domaine du diagnostic médical car ils offrent de nombreux avantages universels, comme un multiplexage facile pour un débit plus élevé, une diminution de la quantité de réactifs et des coûts, une automatisation des tests, une réduction des risques de contamination, et un gain de temps de diagnostic [15], [16], [17].

Cependant, la plupart des systèmes microfluidiques sont encore à l'étape de développement en laboratoire de recherche. En effet, si l'étape d'analyse a été largement étudiée, celle de la préparation de l'échantillon reste le principal défi dans le domaine du diagnostic miniaturisé.

2.1 Méthodes classiques d'extraction

Les biofluides en général sont des solutions hétérogènes, ils sont constitués de différents types et lignées de cellules. En conséquence, les analyses sur de tels échantillons hétérogènes nécessitent une étape de préparation de l'échantillon en vue de donner une population de cellules purifiées. Les techniques classiques de séparation et de tri des cellules permettent la classification et la séparation des cellules en fonction des caractéristiques des cellules, notamment la taille, la densité et le contenu des cellules, tel que les protéines et l'ADN [18], [19]. Les méthodes immunologiques sont généralement utilisées pour identifier le contenu des cellules, tandis que les méthodes sans marqueur telles que la centrifugation et la filtration sont largement utilisées comme étape de préparation pour l'analyse ou pour un tri et une séparation supplémentaire. Les techniques classiques de séparation et de tri des cellules fréquemment utilisées sont présentées dans le tableau 1.2 ci-dessous.

	Technique	Principe	Avantages	Inconvénients
Méthodes sans marqueur	Centrifugation	Densité	Processus simple Peu coûteuse Haut débit	Faible pureté Faible rendement
	Filtration	Taille		
	Adhérence	Adhérence		
	Culture	Croissance		
Méthodes immunologiques	FACS	Anticorps	Haute pureté Haut rendement	Coût élevé Complexité du marquage Marqueur pas stable
	MACS	Anticorps		
	Adhérence spécifique (Panning)	Anticorps		

Tableau 1. 2 Comparaison des techniques classiques de tri cellulaire [14]

2.1.1 Méthodes sans marqueur

Les méthodes de tri cellulaire sans marqueur séparent les cellules en fonction des propriétés physiques des cellules, telles que la taille, la déformabilité, la polarisabilité électrique, l'adhésion et la densité.

Les méthodes généralement utilisées reposent sur les procédés suivants : la filtration, la centrifugation, la séparation basée sur l'adhérence cellulaire et la culture cellulaire. Ces méthodes permettent la séparation d'un grand nombre de cellules souhaitées de manière relativement simple. Plus important encore, les cellules séparées en utilisant des techniques sans marqueur sont facilement disponibles pour une analyse ultérieure et même à des fins thérapeutiques. Cependant, la séparation est réalisée de manière qualitative plutôt que quantitative et la pureté de séparation est généralement faible.

La centrifugation sépare les cellules par leurs différences de densité. La centrifugation est une technique de séparation cellulaire couramment utilisée en routine en laboratoire car elle convient à la séparation d'un grand nombre de cellules d'une manière relativement simple et peu coûteuse. Les cellules sont soumises à une force centrifuge et sont séparées en fonction de leur densité. La rosette érythrocytaire est également une technique de séparation largement utilisée basée sur la densité pour épuiser une population cellulaire, qui est une combinaison de liaison d'anticorps et de centrifugation [20], [21]. La liaison activée par les anticorps avec un lieur entre les cellules non cibles et les érythrocytes conduit à la formation d'agrégats, qui sont plus denses que les autres types de cellules d'intérêt et peuvent être éliminés par centrifugation.

Pour faciliter l'extraction de bactéries dans le sang, il est possible de réaliser au préalable la lyse sélective des cellules sanguines. Il est de pratique courante de prélever le sang par ponction veineuse directement dans un tube contenant de la saponine, qui perméabilise les cellules sanguines [22] (voir figure 1.4).

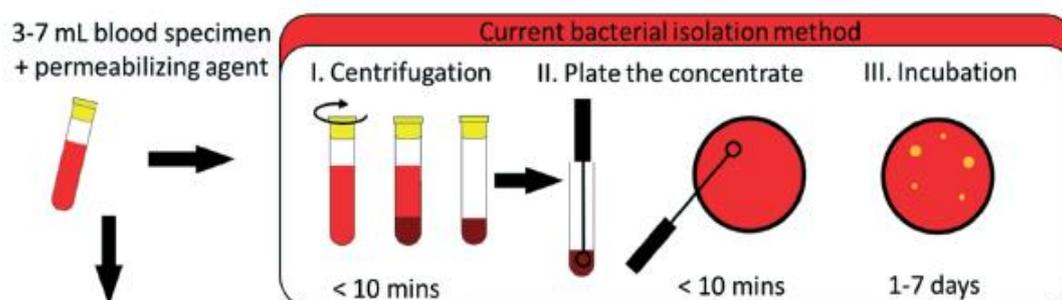


Figure 1. 4 Méthode de lyse et centrifugation à l'échelle macroscopique [22].

La saponine lyse tous les constituants du sang afin d'obtenir une solution qui contient les bactéries 100 pour cent viables avec les débris [2]. Cette méthode concentre les bactéries cibles avant de placer l'échantillon sur un support solide et d'incuber les plaques pendant plusieurs heures voire plusieurs jours jusqu'à ce que les colonies bactériennes soient visibles [22]. Cette technique est efficace mais le nombre important d'étapes induit un risque de contamination très élevé. De plus, cette technique présente des problèmes associés à une faible pureté et à la perte de cellules cibles. La faible pureté peut être surmontée par des centrifugations répétées dans différentes conditions (densité du milieu et vitesse angulaire).

La séparation cellulaire par filtration est une méthode simple et peu coûteuse pour séparer les constituants en fonction de leur taille en utilisant des membranes dont la porosité est contrôlée de façon à sélectionner la sous-population recherchée. La filtration est typiquement utilisée pour une purification supplémentaire des cellules, et elle est particulièrement utile dans la préparation de suspensions cellulaires uniques par élimination d'agrégats cellulaires et de grosses particules. La filtration est également utilisée pour concentrer et retenir les cellules plus grosses pour la préparation des échantillons avant l'analyse cytologique.

Les membranes de séparation des cellules sont traditionnellement constituées de colonnes de coton ou de filtres en cuivre, et plus récemment, de mailles en polymère, par exemple, faites de nylon et de polyéthylène téréphtalate (PET). Un inconvénient notable de la filtration est la quantité importante de perte de cellules au cours du processus additionné au risque de colmatage de la membrane filtrante.

L'adhésion cellulaire à un substrat peut également être utilisée comme technique de séparation. La séparation basée sur l'adhésion cellulaire enrichit les cellules souhaitées en éliminant les cellules qui ne se fixent pas au substrat cellulaire. Par conséquent, la séparation basée sur l'adhérence n'est utilisée que lorsqu'une pureté élevée n'est pas requise ou qu'un épuisement d'un type de cellule spécifique est nécessaire. La séparation est généralement réalisée sur une boîte en plastique de culture tissulaire, mais des méthodes plus raffinées utilisent des billes de verre greffées avec des brosses en polymère [23] ou des surfaces micro / nano structurées [24]. Les cellules souches mésenchymateuses sont les cellules qui ont été isolées pour la première fois en utilisant une telle approche à partir d'aspirat de moelle osseuse. Ces cellules se propagent et adhèrent fortement à ces surfaces plastiques rigides.

La culture cellulaire est une méthode qui peut être utilisée aussi comme technique de séparation cellulaire en utilisant un milieu qui stimule ou inhibe la croissance de certains types

de cellules. Par exemple, dans le processus de greffe de moelle osseuse, une culture de moelle osseuse à long terme dans des milieux contrôlés peut être utilisée pour augmenter sélectivement les cellules souches hématopoïétiques [25]. Ces méthodes peuvent fournir une population cellulaire relativement homogène ; cependant, les échantillons qui en résultent ne sont pas les cellules d'origine mais les cellules développées.

2.1.2 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques de tri cellulaire séparent les cellules en utilisant un anticorps monoclonal qui se lie à un composant cellulaire. Typiquement, un anticorps est sélectionné pour identifier un seul (ou quelques) marqueur(s) de surface cellulaire, il est conjugué avec des molécules fluorescentes ou attaché à des microparticules pour séparer les cellules cibles. En raison de la spécificité élevée de la liaison anticorps-antigène, les techniques de séparation et de tri à base d'anticorps peuvent fournir une pureté beaucoup plus élevée que les techniques sans marqueur. Cependant, les techniques à base d'anticorps présentent certains inconvénients liés au marquage. Premièrement, le marquage avec des molécules fluorescentes et des anticorps peut affecter le devenir et les fonctions des cellules, ce qui affecte l'analyse en aval et l'efficacité des thérapies. Deuxièmement, un processus de marquage prend souvent beaucoup de temps et de main-d'œuvre, ce qui ajoute des difficultés et des coûts. Enfin, pour une application pratique de séparation et de tri, le choix des anticorps est limité au sein des anticorps disponibles dans le commerce, ce qui à son tour limite la séparation des cellules avec des marqueurs spécifiques. Les techniques de séparation cellulaire à base d'anticorps largement utilisées comprennent l'adhésion cellulaire spécifique (Panning), et les méthodes MACS et FACS.

Avec **la méthode de l'adhésion cellulaire** spécifique, les cellules ayant des antigènes spécifiques peuvent être fixées de manière sélective sur une surface revêtue d'anticorps. En règle générale, les anticorps sont adsorbés sur une surface en plastique, telle que des boîtes de Pétri ou des microparticules de polymère. L'adhésion cellulaire spécifique peut fournir une grande pureté mais une perte de cellules élevée est inévitable, et une séparation quantitative basée sur l'expression de surface n'est pas réalisable, donnant seulement une séparation binaire. Par rapport à d'autres techniques basées sur des anticorps, il est plus facile de libérer des cellules et les cellules séparées qui peuvent être utilisées pour une analyse ou une thérapeutique plus approfondie.

La technique MACS utilise des particules magnétiques conjuguées à des anticorps pour cibler un marqueur de surface cellulaire spécifique. Sous un champ magnétique produit par un aimant

permanent, les cellules marquées par des billes magnétiques peuvent être collectées de manière sélective. Les particules magnétiques sont disponibles dans le commerce avec une diversité non seulement en taille et en matériau, mais également avec une modification de surface ou une conjugaison d'anticorps.

La technique FACS est l'une des techniques de tri cellulaire les plus puissantes fondées sur la cytométrie en flux. Les cellules individuelles sont identifiées grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux marqués généralement par un fluorophore, la fluorescéine, qui reconnaissent les marqueurs de surface. Les faisceaux laser illuminent chaque cellule individuellement, cette dernière est analysée et triée suivant plusieurs paramètres (taille, granulosité, intensité de fluorescence, etc.). À ce stade, la lumière diffusée et les signaux fluorescents sont générés et détectés par plusieurs détecteurs. Les décisions de tri sont prises sur la base de ces signaux, qui fournissent des informations quantitatives sur la taille des cellules et la quantité d'anticorps marqués par fluorescence liés à la membrane cellulaire et/ou aux structures internes des cellules.

Les cytomètres en flux modernes peuvent offrir un débit de l'ordre de 10 000 cellules/s, ce qui est assez élevé mais inférieur aux techniques de tri en vrac comme le MACS ou la centrifugation.

La technique MACS permet un débit beaucoup plus élevé mais une qualité moindre que la FACS, elle n'est pas vraiment adaptée lorsqu'on ne connaît pas l'identité de la cellule que l'on veut capturer, et de plus, il est difficile de sélectionner les bons anticorps pour cibler le pathogène [26]. Un autre inconvénient important est la difficulté de détacher et d'enlever les billes après qu'elles aient été fixées.

Pour conclure, la centrifugation et les techniques FACS ou MACS sont généralement utilisées pour la séparation de cellules rares, l'idéal étant d'atteindre un débit de séparation élevé tout en maintenant une pureté et un rendement élevés (faibles pertes). MACS fournit un débit très élevé mais elle ne permet pas le marquage basé sur plusieurs marqueurs et le détachement des cellules collectées est difficile. FACS peut analyser plusieurs signaux mais son débit reste un facteur limitant pour les cellules rares.

En tant qu'alternative aux méthodes de diagnostic existantes, longues et fondées sur la culture pour l'identification des organismes, les dispositifs microfluidiques sont apparus comme des plateformes rapides, à haut débit et intégrées pour l'enrichissement, la détection et la caractérisation des bactéries et des champignons.

3 Intérêt de la microfluidique

La microfluidique permet de fabriquer des dispositifs parfaitement adaptés aux applications analytiques, que ce soit pour le diagnostic précoce de maladies ou pour l'avancement de la recherche pharmaceutique [27]. Ces dispositifs microfluidiques sont appelés "laboratoire sur puce" ou "Lab-on-a-Chip" (en anglais) qui intègrent, sur quelques centimètres carrés, toutes les fonctions d'analyses chimiques réalisées aujourd'hui dans les laboratoires de biologie médicale [15], [16].

La microfluidique, ou l'art de manipuler des petits volumes à l'échelle micrométrique, peut être définie comme la science étudiant le transport des fluides de l'échelle de quelques microns à quelques centaines de microns. Ce changement d'échelle par rapport aux méthodes traditionnelles modifie le comportement des fluides et présente plusieurs avantages notables pour les applications de tri et de séparation de cellules : (1) la nature laminaire de l'écoulement de fluide à ces échelles permet le confinement des cellules dans une ligne de courant contrôlée étroite, (2) le champ d'écoulement peut avoir des gradients de vitesse à l'échelle des cellules, ce qui permet des mécanismes de séparation qui ne sont pas possibles à l'échelle macroscopique, comme par exemple, des séparations hydrodynamiques, (3) les petites dimensions du dispositif permettent la génération de champs électriques ou magnétiques puissants et leur gradient, (4) un rapport surface / volume élevé augmente la surface où des cellules peuvent se fixer, (5) plusieurs dispositifs microfluidiques peuvent être intégrés pour effectuer une chaîne d'analyse, qui comprend un protocole complet de techniques différentes sur un même dispositif miniaturisé. Nous verrons que c'est l'approche choisie dans ce travail de doctorat.

Afin de comprendre pourquoi la microfluidique est en plein essor, mais aussi de cerner plus précisément les différentes méthodes microfluidiques permettant d'isoler et de concentrer des agents pathogènes, la section suivante introduira la physique des écoulements des fluides en microsystèmes.

3.1 Loi d'écoulement de flux dans des microcanaux fluidiques

L'essor de la microfluidique pour le tri cellulaire est lié au comportement particulier des fluides à l'échelle microscopique. L'écoulement d'un fluide dans le canal est caractérisé à l'aide d'un nombre, dénommé nombre de Reynolds (Re) (eq.1). Re est un nombre sans dimension, utilisé en mécanique des fluides pour caractériser le régime de l'écoulement, il permet de quantifier l'importance relative des forces visqueuses par rapport aux forces d'inertie.

$$Re = \frac{\text{Terme inertiel}}{\text{Terme visqueux}} = \frac{\rho_f v_f D_h}{\mu} \quad \text{Équation 1}$$

où v_f est la vitesse de l'écoulement (en m/s), ρ_f est la densité du fluide (en kg.m⁻³), μ est la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s) et D_h le diamètre hydraulique du canal qui est défini comme :

$$D_h = \frac{2wh}{w+h} \quad \text{Équation 2}$$

où w et h correspondent respectivement à la largeur et à la hauteur du canal.

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

Si $Re > 2000$, on parle d'écoulement turbulent (figure 1.5(i))

Si $Re < 2000$, on parle d'écoulement laminaire (figure 1.5(ii))

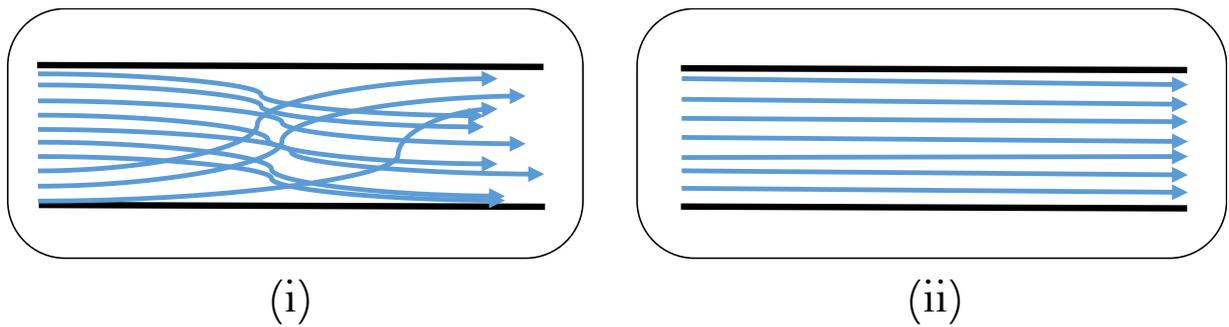


Figure 1. 5 Illustration du type d'écoulement en fonction du nombre de Reynolds

Pour les écoulements dans un dispositif microfluidique dédié à l'analyse de biomolécules, les fluides sont constitués de solutions aqueuses. Ces solutions aqueuses sont donc incompressibles et présentent un comportement de fluide newtonien : la viscosité reste constante indépendamment de la contrainte de cisaillement et de l'historique de chargement. A l'échelle micrométrique, l'équation de Navier-Stokes, qui régit le mouvement du fluide, définit le comportement de l'écoulement du fluide visqueux newtonien et incompressible (équation 3) [6].

$$\frac{\partial \vec{v}_f}{\partial t} + (\vec{v}_f \cdot \vec{\nabla}) \vec{v}_f = \frac{-1}{\rho_f} \vec{\nabla} P + \frac{\mu}{\rho_f} \Delta \vec{v}_f \quad \text{Équation 3}$$

où P désigne la pression (en Pa).

L'écoulement de Poiseuille d'un fluide newtonien incompressible à travers un canal rectiligne de diamètre d (en m), qui décrit l'écoulement laminaire, présentera une vitesse parabolique, c'est-à-dire un profil d'écoulement avec une vitesse maximale au centre et une vitesse nulle aux parois du canal (voir figure 1.6).

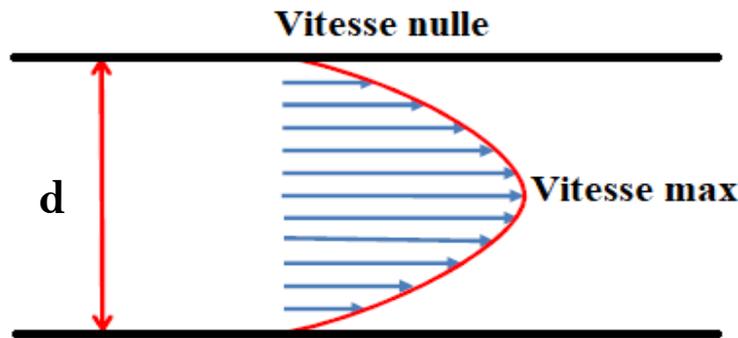


Figure 1. 6 Profil de vitesse parabolique (flèches bleues) [6]

Cette propriété peut être exploitée pour la séparation de particules dans un écoulement laminaire en les positionnant, par exemple, à des hauteurs différentes du canal microfluidique.

3.2 Résistance fluidique

En microfluidique, la section du canal a une influence sur l'écoulement du fluide. En effet, plus le canal est étroit, plus l'écoulement est difficile. A chaque canal microfluidique, on peut associer une résistance hydraulique R_h qui représente l'opposition à l'écoulement.

La résistance hydraulique R_h caractérise la relation entre le débit Q (en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et la chute de pression ΔP (en Pa) le long de la longueur du canal, sous la forme d'une loi de Poiseuille :

$$R_h = \frac{\Delta P}{Q} \quad \text{Équation 4}$$

Cette résistance est directement proportionnelle à la viscosité du fluide et à la longueur du canal, et elle est inversement proportionnelle à la section du canal. Pour un canal rectangulaire, la résistance hydraulique R_h peut s'écrire de la manière suivante [28] :

$$R_h = \frac{12\mu L}{1 - 0.63 \left(\frac{h}{w}\right)} \frac{1}{wh^3} \quad \text{Équation 5}$$

où μ est la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s), L est la longueur du canal (en m), h est la hauteur du canal (en m) et w est la largeur du canal (en m).

Lorsque deux (ou plusieurs) canaux de différentes largeurs se connectent en série (voir figure 1.7), la résistance hydraulique résultante est égale à la somme des résistances hydrauliques des canaux, sous la condition que le nombre de Reynolds reste petit et que l'on néglige la perte de charge liée au changement brutal de la largeur des canaux à leur intersection [28] :

$$R_h = R_{h1} + R_{h2} \quad \text{Équation 6}$$

Étant donné que le débit dans tous les canaux connectés en série est constant ($Q = Q_1 = Q_2$) et que la pression totale est égale à la somme des pressions dans les différents canaux, la loi de Poiseuille s'écrit alors :

$$\Delta P = (R_{h1} + R_{h2}) Q \quad \text{Équation 7}$$

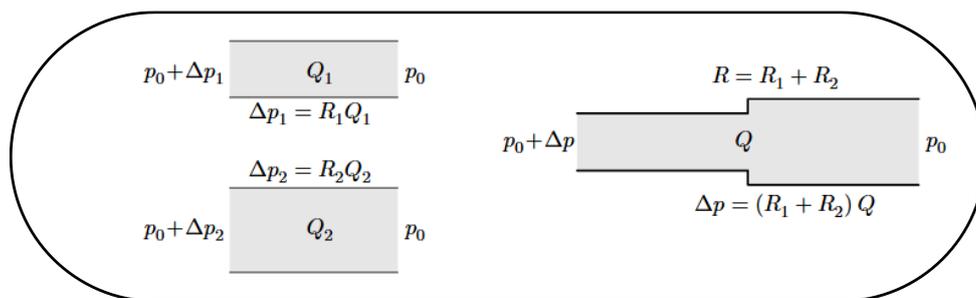


Figure 1. 7 Couplage en série de deux canaux de résistance hydraulique R_{h1} et R_{h2} . La loi d'additivité des résistances hydrauliques est valable dans la limite des nombres de Reynolds faibles [28].

Dans le cas où les canaux se connectent en parallèle (figure 1.8), la résistance hydraulique résultante s'écrit, toujours sous la condition d'un faible nombre de Reynolds de la façon suivante :

$$R_h = \left(\frac{1}{R_{h1}} + \frac{1}{R_{h2}} \right)^{-1} \quad \text{Équation 8}$$

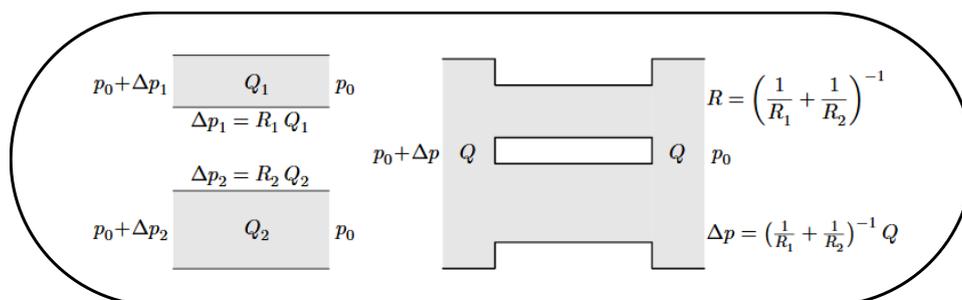


Figure 1. 8 Couplage en parallèle de deux canaux de résistance hydraulique R_{h1} et R_{h2} . La loi d'additivité des inverses des résistances hydrauliques est valable dans la limite des nombres de Reynolds faibles [28].

Dans ce cas, la différence de pression est constante et le débit total est égal à la somme des débits de tous les canaux.

Les résistances hydrauliques dans notre circuit microfluidique (module de lyse + module de tri) ont été calculées dans l'annexe 2.

3.3 Diffusion et mélange : Nombre de Peclet

Le mouvement brownien est le mouvement aléatoire de particules en suspension immergées dans un fluide (liquide ou gaz), qui résulte de leur collision fréquente avec les atomes ou les molécules du gaz ou du liquide.

Il existe deux types de transport de matière : 1) la diffusion et 2) la convection. A l'échelle macroscopique habituelle, un mélange de réactifs peut se faire de manière quasi-instantanée grâce à la convection : en agitant la solution, l'écoulement devient turbulent et permet aux réactifs de se mélanger rapidement (comme le sucre dans le café) [29]. En revanche, en microfluidique, en absence d'obstacles ou de forces extérieures, les réactifs suivent la direction de l'écoulement sans se mélanger sur de grandes distances. Le mélange de deux liquides ne peut se faire, en effet, que par diffusion latérale. Selon la théorie d'Einstein-Smoluchowski, la distance quadratique moyenne pour qu'une particule diffuse en un temps t est exprimée par r [30]:

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt \quad \text{Équation 9}$$

où D est le coefficient de diffusion, qui est défini comme suit selon la relation de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu a} \quad \text{Équation 10}$$

où k est la constante de Boltzmann (environ $1,38 \times 10^{-23}$ J/K), T est la température, μ est la viscosité du milieu et a est le diamètre de la particule. D'après l'équation ci-dessus, nous pouvons voir que plus la température T est élevée, plus le coefficient de diffusion D est grand. En revanche, plus la taille des particules a est grande ou plus la viscosité du milieu μ est élevée, plus le coefficient de diffusion est faible. En outre, lorsque le système particules-fluide n'est pas statique, mais se déplace le long du microcanal, le nombre de Peclet (Pe) peut être utilisé pour évaluer l'importance relative de la convection par rapport à la diffusion. Le nombre de Peclet permet de caractériser la nature du transport de matière. Il est défini comme suit :

$$Pe = \frac{h \times v_f}{D} \quad \text{Équation 11}$$

où h et v_f sont respectivement la hauteur du canal et la vitesse du fluide.

Pe est défini d'une autre manière comme le rapport entre le temps de diffusion et le temps de convection : Nombre de Peclet = temps de diffusion/temps de convection = $\frac{T_D}{T_C}$

- Si $Pe > 1$: l'écoulement est convectif, la matière est principalement transportée par l'écoulement (figure 1.9a)
- Si $Pe < 1$: c'est la diffusion qui domine (figure 1.9b) permettant un « mélange » entre les deux liquides.

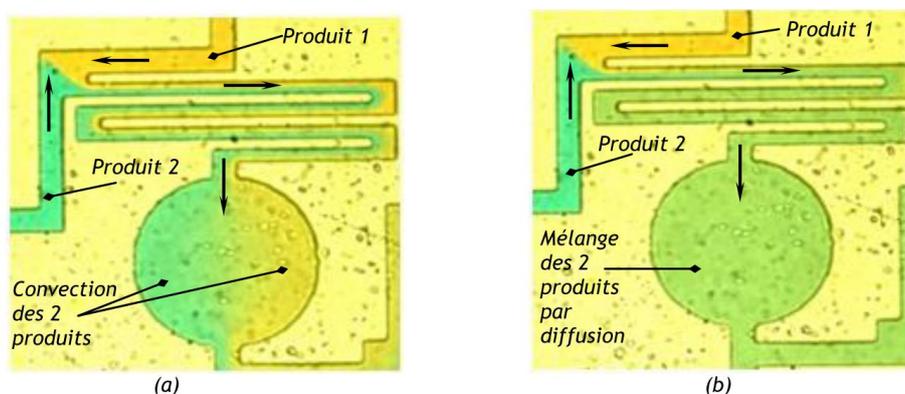


Figure 1. 9. (a) $Pe > 1$, Convection des 2 produits, (b) $Pe < 1$, convection et diffusion des 2 produits [31].

Pour effectuer un mélange en microfluidique, on peut agir simplement sur la taille des canaux de manière à se mettre dans une configuration où $Pe < 1$: par exemple, on allonge le canal pour augmenter le temps de convection [31].

4 Etat de l'art sur les techniques microfluidiques pour l'isolement des cellules et de microparticules

Les techniques d'isolement des agents pathogènes peuvent être classées en deux grandes catégories : les méthodes chimiques et les méthodes physiques. Parmi les approches chimiques, la déplétion des cellules sanguines par lyse chimique est la méthode la plus utilisée dans le monde de la microfluidique, en raison de sa simplicité et de son maniement aisé [2], [32].

Concernant les approches physiques, elles peuvent aussi être classées en fonction de leur principe physique en (1) manipulation active qui nécessite des forces extérieures (acoustophorèse, diélectrophorèse, magnétophorèse, etc...), ou en (2) manipulation passive,

c'est-à-dire utilisant uniquement les forces intérieures au systèmes (microfluidique inertielle) [33].

Nous allons présenter dans cette section les différentes méthodes prometteuses d'isolement des agents pathogènes contenus dans un échantillon sanguin (figure 1.10), en accordant une attention particulière aux méthodes existantes de la microfluidique inertielle.

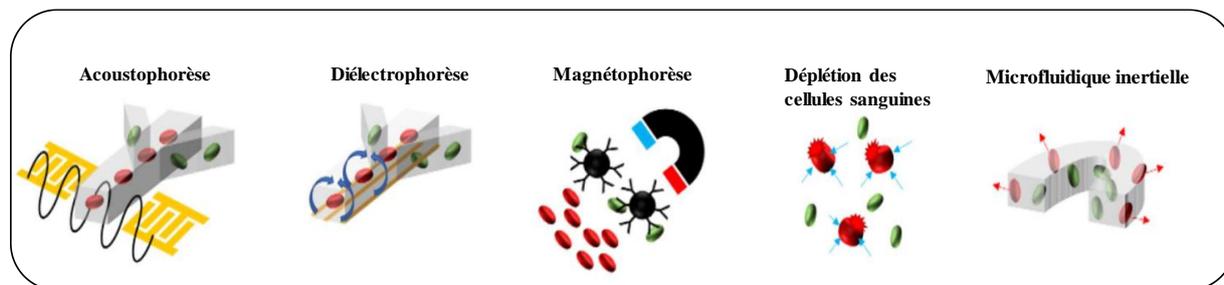


Figure 1. 10 Les différentes techniques d'isolement des agents pathogènes [33]

Ce chapitre va se diviser en deux parties : 1) les méthodes physiques permettant de trier et donc d'isoler les cellules cibles, et 2) les méthodes chimiques permettant de lyser les cellules sanguines.

4.1 Isolement des cellules par les approches physiques

4.1.1 Acoustophorèse

La méthode de tri acoustophorétique permet de trier les entités biologiques en les soumettant à une onde acoustique. Cette onde va alors pouvoir dévier ces entités en fonction de leur taille mais aussi de leur forme, densité, compressibilité, etc. De ce fait, la séparation acoustique peut donc être mise en œuvre dans des mélanges hétérogènes comme le sang. Si cette méthode est choisie pour extraire des bactéries du sang, la lyse des cellules sanguines n'est pas alors nécessaire. Les ondes acoustiques générées vont induire une force vers les points d'invariance de l'onde stationnaire acoustique. En jouant sur la fréquence de l'onde acoustique, on pourra alors établir plusieurs positions d'équilibre. Cependant, la force induite par ces ondes va principalement affecter les particules les plus grosses. Dans le cas d'une solution sanguine contenant des bactéries, ce sont les globules rouges et les globules blancs qui vont être déviés. Les bactéries plus petites vont quant à elles être légèrement excentrées comme le montre la figure 1.11 suivante [34], ce qui va permettre de les isoler en collectant la solution centrale. Même si cette technique permet de ne pas lyser les cellules sanguines présentes dans l'échantillon, elle reste néanmoins une méthode assez lente quant au tri d'objets biologiques dans le sang infecté. Parmi les études les plus avancées sur le sujet, on peut citer les travaux

de Ai *et al.* qui ont réussi à obtenir un tri des *E. Coli* avec une efficacité de 95% en utilisant un débit $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ [34].

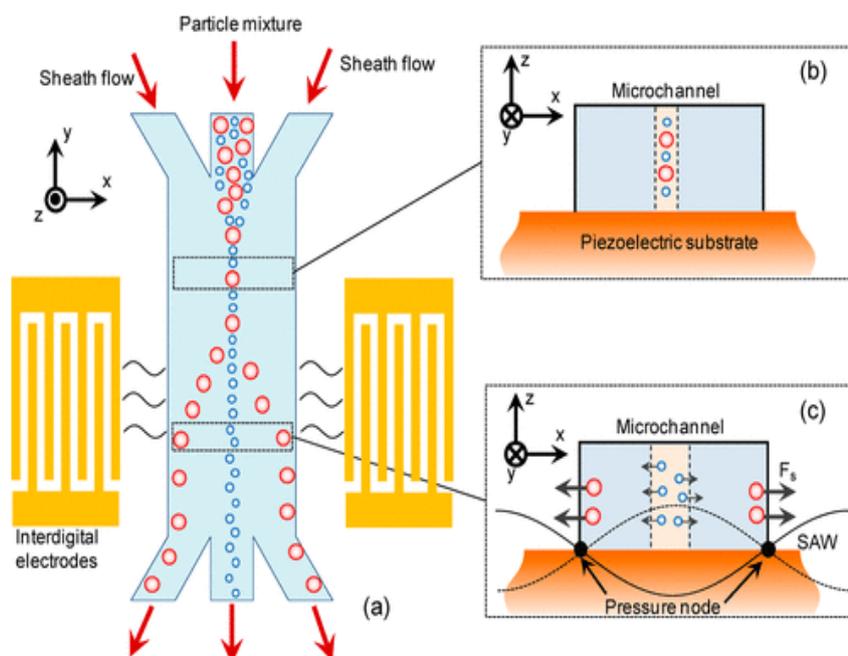


Figure 1. 11 Schéma du tri de particules par acoustophorèse pour un fluide hétérogène [34].

D'autres équipes de recherche ont pu obtenir des résultats prometteurs comme Ohlsson *et al.* en couplant un module acoustophorétique et une micro puce PCR à réactifs secs, permettant d'identifier *E. Coli* dans la moitié des cas observés. Cependant, cette méthode ne peut identifier les bactéries au-delà de 10^3 UFC/mL pour un débit de $50 \mu\text{L}/\text{min}$ [35]. Nous n'avons donc pas choisi cette méthode car elle ne permet pas de travailler des débits élevés.

4.1.2 Diélectrophorèse

La méthode de tri diélectrophorétique utilise un champ électrique externe pour focaliser les particules en suspension dans un fluide. L'utilisation de la diélectrophorèse pour capturer les cellules cibles évite d'avoir à utiliser des réactifs biologiques coûteux pour distinguer les bactéries cibles des cellules sanguines de fond. L'application d'un champ électrique non uniforme à la suspension de cellules provoque l'accumulation de porteurs de charge aux interfaces membranaires, ce qui provoque la polarisation électrique des cellules. La fréquence du champ peut être ajustée afin de jouer sur la polarisation effective des cellules et donc sur leur mouvement. On peut choisir d'orienter la trajectoire des bactéries vers les maxima du champ électrique (diélectrophorèse positive) situés près des bords des microélectrodes ou les en éloigner (diélectrophorèse négative).

En 2011, Kuczenski *et al.* ont réalisé une expérience sur un dispositif diélectrophorétique négatif dans le but de trier des bactéries *E. Coli*. Ils ont réussi à récupérer 30% des bactéries viables dans du sang pour un débit de 0,6 $\mu\text{L}/\text{min}$ [36]. Dans la même année 2011, Gao *et al.* ont réalisé une expérience similaire, mais avec un tri par diélectrophorèse positif. Ils ont ainsi pu trier les bactéries avec une efficacité de 97% avec un débit compris entre 0,1 et 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ [37]. De plus, le dispositif a pu trier simultanément trois types de bactéries : *E. Coli*, *Bacillus globigii* et *A. baumannii*.

En 2015, Bisceglia *et al.* ont réalisé une expérience de tri par diélectrophorèse positif. Ils ont pu trier les bactéries avec une efficacité de 97% avec un débit compris entre 0,15 et 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$ [38]. Le dispositif a permis de trier simultanément des bactéries *E. Coli*, des *Staphylococcus aureus* et des *Candida albicans*.

En 2017, D'Amico *et al.* ont travaillé sur l'isolement des *E. coli* et *S. aureus* dans le sang par dialyse et diélectrophorèse sans membrane microfluidique [22]. Ils ont réussi à récupérer 79% des bactéries viables dans du sang (figure 1.12).

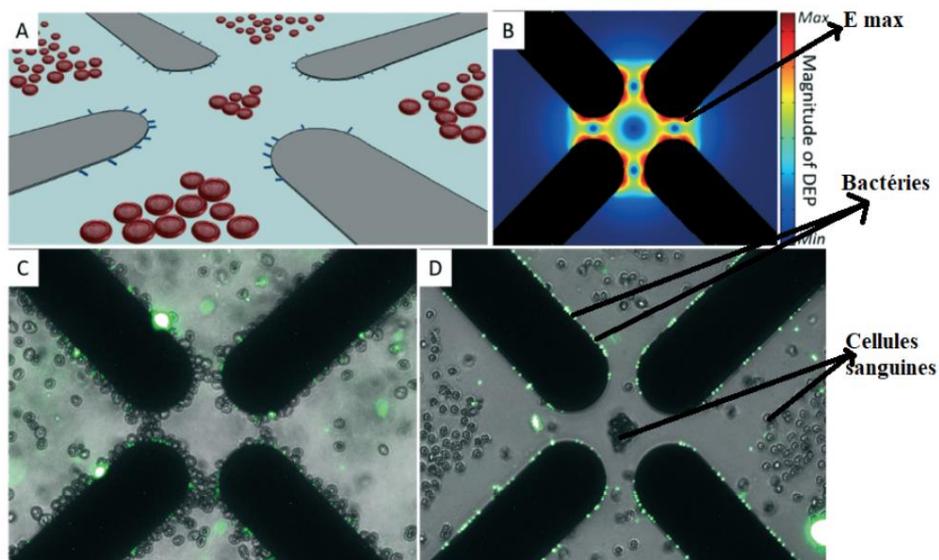


Figure 1. 12 Discrimination des bactéries et des cellules sanguines humaines via la diélectrophorèse [22]

Nous pouvons toutefois noter que les débits utilisés dans cette méthode sont relativement trop faibles pour être compatibles avec un test/diagnostic sur puce rapide.

De plus, pour exploiter au mieux le potentiel de la diélectrophorèse comme méthode de tri cellulaire, il est nécessaire de diminuer au mieux la conductivité du milieu. Ceci est possible en diluant fortement la solution avec un milieu faiblement conducteur. On constate tout de suite,

que cette approche n'est pas idéale pour un échantillon contenant une toute petite quantité de bactéries, comme les échantillons sanguins de patients atteints de septicémie. En effet, cette approche va encore diminuer la concentration en bactéries déjà très faible au départ. Cette approche n'est donc pas envisageable pour notre application.

4.1.3 Magnétophorèse

Parmi les méthodes actives de tri, le tri immunomagnétique est celle la plus utilisée dans le monde de la recherche. Cette méthode consiste à greffer à la surface de microbilles magnétiques des ligands capables de capturer les bactéries présentes dans le sang. Parmi ces ligands, on peut citer la vancomycine, la daptomycine et l'héparine [39]. Lorsque les bactéries sont accrochées aux billes, il suffira alors d'appliquer un champ magnétique afin de dévier les microbilles auxquelles les bactéries sont attachées. Les cellules sanguines quant à elles ne seront pas impactées par le champ magnétique permettant alors le tri. La plupart du temps, les billes magnétiques sont utilisées en plus d'un filtre [40]. Ce dernier va permettre un premier tri entre les plus petites entités et les plus grosses. Après filtration, il ne restera que les plaquettes ainsi que les agents pathogènes ciblés. C'est ici que les microbilles magnétiques entrent en jeu en récoltant les bactéries à l'aide des ligands qui ont été attachés préalablement. On utilise enfin un champ magnétique afin de dévier ces microbilles vers un endroit localisé de la puce dans le but de les séparer des plaquettes [40]. En 2020, Fang *et al.* ont utilisé cette technique afin de séparer les bactéries du sang, ils ont réussi à éliminer 99,5 % des globules rouges (et tous les globules blancs) à une vitesse de $\sim 20 \mu\text{L}/\text{min}$ et à récupérer $\sim 70 \%$ des bactéries (figure 1.13).

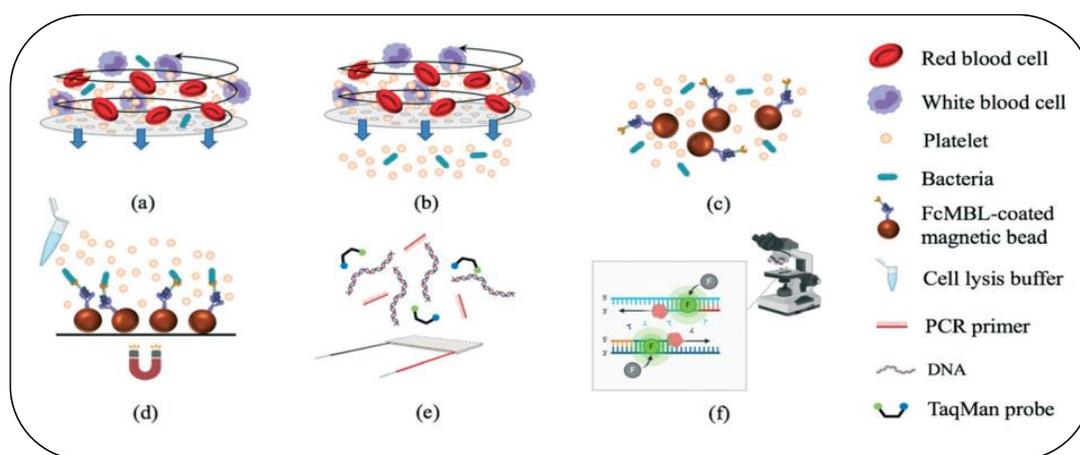


Figure 1. 13 Schéma du tri des bactéries dans du sang par magnétophorèse [40].

Bien que cette méthode soit très efficace dans l'extraction des bactéries du sang, elle est néanmoins assez lente contrairement à d'autres méthodes que nous verrons plus loin. De plus,

afin que les bactéries se lient aux microbilles magnétiques, il faut utiliser des ligands compatibles avec la bactérie infectieuse. Il est alors nécessaire d'incorporer différents types de ligands compatibles avec l'ensemble des bactéries infectieuses connues. De plus, ces ligands ne doivent pas interagir avec les cellules sanguines car cela pourrait diminuer l'efficacité du tri des bactéries. On voit donc clairement les limites de ces techniques.

Pour les applications biomédicales, un débit élevé est essentiel pour traiter un grand volume d'échantillon et fournir des résultats cohérents pour aboutir à un diagnostic précis. Les techniques actives mentionnées ci-dessus ont été largement utilisées dans les applications biomédicales mais, elles fonctionnent à faible débit et elles nécessitent un champ de force externe.

En revanche, un dispositif microfluidique basé sur une méthode passive sera plus simple à mettre en œuvre et nous verrons que l'utilisation d'un débit considérablement plus élevé sera possible. En raison de sa capacité à séparer les particules à un débit élevé, la microfluidique inertielle a attiré récemment une attention considérable. Cette technique utilise des forces générées passivement dans des microcanaux pour aligner et séparer les cellules en fonction de nombreux facteurs, notamment la taille, la forme et la déformabilité des particules ou des cellules en suspension. Dans ma thèse, c'est cette approche basée sur la microfluidique inertielle que nous avons choisi d'étudier pour isoler les agents pathogènes (*E. Coli*) dans le lysat sanguin.

Afin de présenter les différentes méthodes d'isolement et d'enrichissement des agents pathogènes basées sur la microfluidique inertielle, nous développerons dans la section suivante les bases de la physique de la microfluidique inertielle.

4.1.4 Microfluidique inertielle

La migration inertielle a été découverte en 1961 par Serge et Silberberg. Ces deux chercheurs ont mené des expériences dans un tube cylindrique droit (rayon intérieur $\sim 5,6$ mm) avec des particules rigides (diamètre ~ 1 mm) et ont observé que des particules initialement dispersées de façon aléatoire se concentraient, à une distance donnée de l'entrée du canal, sur un anneau dont le rayon était d'environ 0,6 fois le rayon du tube [41]. Ce phénomène a attiré l'attention de nombreux chercheurs, et de nombreux travaux ont été faits pour étudier l'effet de la focalisation inertielle dans différentes conceptions de sections et de canaux [42].

Les migrations de particules dans un canal cylindrique droit et un canal carré ont été rapportées par Di Carlo. Les particules initialement distribuées de manière aléatoire se sont

concentrées sur un anneau (anneau de Serge-Silberberg) dans un canal cylindrique et sur quatre lignes d'équilibre situées près du centre de chaque face du canal carré (figure 1.14).

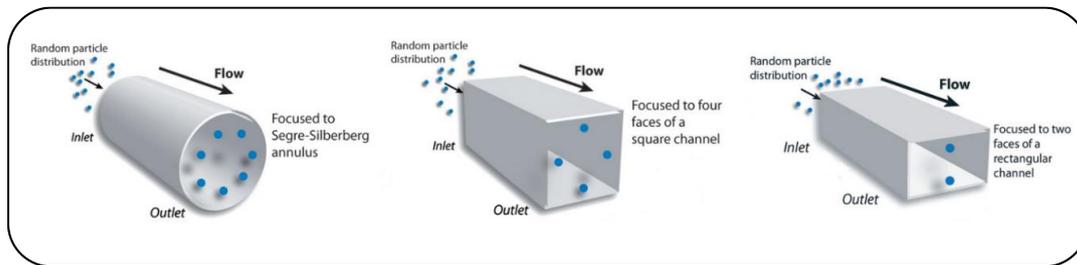


Figure 1. 14 Focalisation inertielle de particules dans un canal cylindrique, un canal carré et un canal rectangulaire, respectivement de gauche à droite sur l'image [43].

Dans un canal rectangulaire, les particules se concentrent vers deux positions d'équilibre centrées sur la grande face du canal, comme le montre la figure 1.14 [43][44]. Le nombre des positions d'équilibres dans les microcanaux rectangulaires dépend du rapport d'aspect (h/w) de la section transversale du canal et du nombre de Reynolds de l'écoulement (Re).

4.1.4.1 Mécanisme de migration inertielle des particules micrométriques dans un canal rectangulaire

Dans notre application, nous avons travaillé sur des canaux rectangulaires en raison de leur simplicité et de leur facilité à être fabriqués par les techniques de microfabrication conventionnelles, qui seront décrites dans le chapitre 2.

Les particules qui s'écoulent dans un microcanal rectangulaire droit sont soumises à deux types de forces : des forces de traînée parallèles à l'écoulement et des forces de portance perpendiculaires à l'écoulement. Les forces de traînée agissent pour accélérer les particules jusqu'à ce qu'elles atteignent la vitesse du fluide et les forces de portance, liées à la viscosité et à l'inertie de l'écoulement, transportent les particules à travers les lignes de courant [43], [44].

L'objectif de cette section est de présenter les différentes forces impliquées dans le processus de migration inertielle de particules à flottabilité neutre [45].

I Théorie de l'effet d'inertie dans les canaux droits

Dans les écoulements en canal droit, il existe quatre différentes forces, dont trois forces de portance, qui agissent sur les particules: (i) la force de traînée visqueuse F_{Drag} (force de Drag), (ii) la force de portance induite par la paroi F_{LW} , qui est une conséquence directe de l'interaction des particules en suspension avec les parois adjacentes, (iii) la force de portance de gradient de cisaillement F_{LS} , due au gradient du taux de cisaillement du fluide et (iv) la force de Magnus

F_{Ω} , due au mouvement de glissement-rotation [46]. Parmi les forces de portance, seule la force induite par la paroi est le résultat direct de l'existence de la paroi, elle est donc nommée directement force de portance de la paroi. L'équilibre de toutes les forces de portance mentionnées ci-dessus déterminera le processus de migration pour un écoulement dans un canal donné.

1.1 Force de traînée visqueuse (Force de Drag)

La force de traînée apparaît lorsqu'un objet se déplace dans un fluide ou, alternativement, lorsqu'un fluide s'écoule devant un objet. L'origine de la force de traînée F_{Drag} réside dans la nécessité de déplacer les éléments du fluide hors du chemin de l'objet en mouvement. Les particules en suspension dans un fluide suivent les lignes de courant en raison de la traînée visqueuse. La force de traînée sur une particule sphérique en mouvement est influencée par le nombre de Reynolds de la particule :

$$Re_p = \frac{\rho_f v_t a}{\mu} \quad \text{Équation 12}$$

où $v_t = (v_f - v_p)$ est la vitesse relative du fluide par rapport à la particule, a est le diamètre de la particule, μ est la viscosité du fluide, v_f et v_p sont respectivement la vitesse du fluide (vitesse de l'écoulement) et la vitesse de la particule. La force de traînée s'exerçant sur une particule sphérique rigide peut être exprimée comme suit selon la valeur de Re_p [47]:

Lorsque Re_p est compris entre 10^{-4} et 0,2,

$$F_{Drag} = 3\pi\mu a(v_f - v_p) \quad \text{Équation 13}$$

Lorsque Re_p est compris entre 0,2 et 10^3 ,

$$F_{Drag} = 3\pi\mu a(v_f - v_p)(1 + 0.15Re_p^{0.687}) \quad \text{Équation 14}$$

1.2 Force de portance induite par la paroi

Une particule s'écoulant dans un microcanal interagit avec les parois du canal, sauf si la particule est soit extrêmement petite ou soit éloignée des parois. Ces interactions ont tendance à repousser la particule loin de la paroi [48], [49]. Un exemple de schéma d'écoulement est présenté à la figure 1.15 [45].

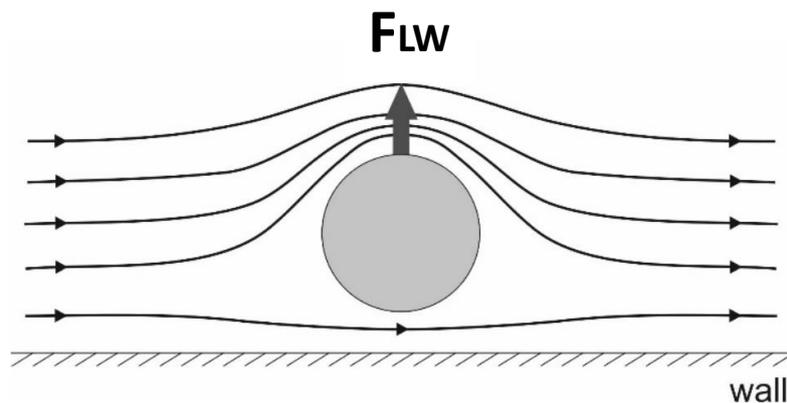


Figure 1. 15 Force de portance induite par la paroi [45]

Lorsque la particule est près de la paroi, les lignes de courant sont déviées vers le côté de la particule éloigné de la paroi, ce qui entraîne des lignes de courant accélérées à cet endroit. Ces lignes de courant asymétriques provoquent un déséquilibre de la pression sur les deux côtés de la particule, ce qui génère une force répulsive, comme le montre la figure 1.18. Cette force augmente de manière inversement proportionnelle à la distance normalisée entre la particule et la paroi [50].

Di Carlo *et al.* en 2009 ont donné une équation empirique basée sur des simulations numériques (COMSOL Multiphysics) pour estimer la force de portance induite par la paroi [51]:

$$F_{LW} \sim \frac{\rho_f \times v_f^2 \times a^6}{D_h^4} \text{ Équation 15}$$

1.3 Force de portance induite par le cisaillement

Dans le cas d'un écoulement à vitesse parabolique typique (Poiseuille), la particule subit une force produite par la courbure du profil de vitesse [48]. Dans un écoulement avec un profil de vitesse parabolique typique, on suppose généralement que la vitesse moyenne de la particule par rapport au fluide est nulle. Mais la vitesse relative dans le référentiel de la particule est plus élevée du côté de la paroi que du côté de la ligne centrale du canal, comme le montre la figure 1.18. Cette dissymétrie entraîne une pression plus faible du côté de la paroi du canal, dirigeant la particule vers la paroi comme le montre la figure 1.16 (en fait, vers la zone où le gradient de cisaillement augmente) [48], [52].

Di Carlo *et al.* (2009) ont également donné une équation empirique pour la force de portance induite par le cisaillement [43] :

$$F_{LS} \sim \frac{\rho_f \times v_f^2 \times a^3}{D_h} \text{ Équation 16}$$

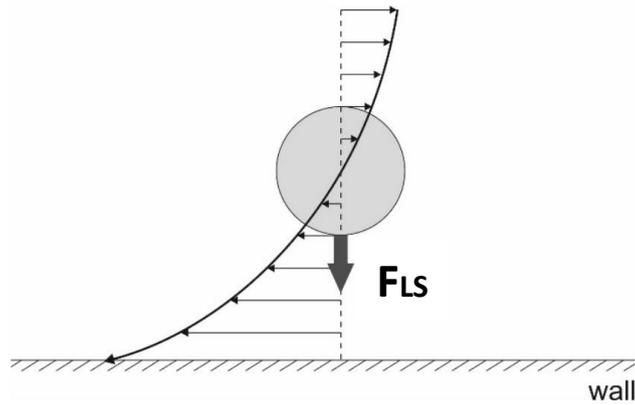


Figure 1. 16 Force de portance induite par le cisaillement

1.4 Force de portance induite par la rotation (Force de Magnus)

Une troisième force de portance est attribuée à la rotation des particules, connue sous le nom d'effet Magnus [44]. En effet, la rotation d'une sphère dans un écoulement crée une pression réduite du côté où la rotation tend à augmenter la vitesse du fluide. Ce déséquilibre de pression provoque une force de portance F_{Ω} , comme le montre la figure 1.17.

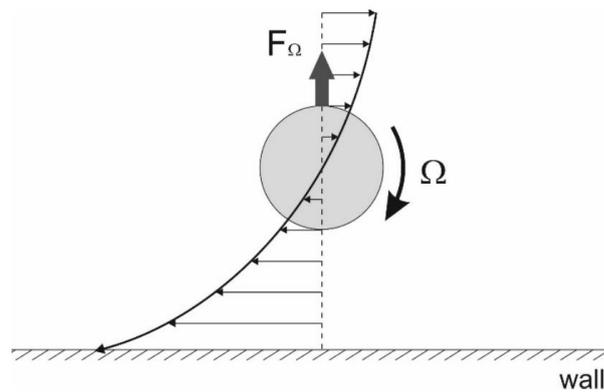


Figure 1. 17 Force de Magnus [45]

Cette force F_{Ω} , induite par la rotation de la sphère, est définie comme [53]:

$$F_{\Omega} = \frac{1}{8} \pi a^3 \rho_f v_f \times \Omega \quad \text{Équation 17}$$

où Ω est le vecteur de vitesse angulaire. La force de Magnus peut être considérée comme le résultat de la différence de pression induite par l'asymétrie de la ligne de courant, due à la rotation de la sphère. Elle est négligeable par rapport à la force de portance induite par le cisaillement lorsque les particules sont éloignées des parois du canal [48], mais elle devient prédominante dans la région des parois où les forces induites par le cisaillement et les forces induites par les parois s'annulent [44].

1.5 Force nette de portance inertielle

Parmi les forces de portance détaillées ci-dessus, la force de Magnus est toujours très faible et négligeable. La force de portance du gradient de cisaillement, qui dirige les particules vers les parois du canal, et la force de portance de la paroi, qui repousse les particules vers la ligne centrale du canal, sont généralement reconnues comme les effets dominants de la migration latérale des particules. L'équilibre entre ces deux forces de portance crée plusieurs positions d'équilibre à mi-chemin entre les parois et la ligne centrale du canal et cette théorie peut raisonnablement expliquer l'observation de Segre et Silberberg [41]. La force de portance inertielle nette agissant sur une petite sphère rigide dans un écoulement de Poiseuille est définie par Asmolov comme [54]:

$$F_L \sim \frac{\rho_f \times v_f^2 \times a^4}{D_h^2} \times f_L \quad \text{Équation 18}$$

f_L est le coefficient de portance qui est défini comme suit [44] :

$$f_L = \frac{D_h^2}{a^2 \sqrt{Re}} \quad \text{Équation 19}$$

f_L varie avec le nombre de Reynolds, pour $Re < 100$ qui est typique pour la plupart des applications microfluidiques, le coefficient de portance reste relativement constant et peut être approximé en moyenne comme $f_L = 0.5$ [55].

La dépendance biquadratique de cette force de portance inertielle nette par rapport au diamètre des particules ($F_L \propto a^4$) fait que les particules ont des positions d'équilibre différentes en fonction de leur taille. Parallèlement, Di Carlo [55] a également indiqué que la force de portance inertielle ne domine les comportements des particules que lorsque le nombre de Reynolds des particules est d'ordre 1.

Dans un canal rectiligne, la vitesse de migration latérale des particules (U_L) et la longueur minimale (L_{min}) requise pour que les particules migrent vers leurs positions d'équilibre inertiel, comme le montre la figure 1.18, peuvent être calculées en équilibrant la force de portance inertielle nette F_L avec la traînée de Stokes F_{Drag} [56]:

$$F_{Drag} = 3\pi\mu a U_L \quad \text{Équation 20}$$

$$U_L = \frac{F_L}{3\pi\mu a} = \frac{\rho_f v_f^2 a^3}{6\pi\mu D_h^2} \quad \text{Équation 21}$$

$$L_{min} \approx \frac{3\pi\mu D_h^3}{\rho_f v_f a^3} \quad \text{Équation 22}$$

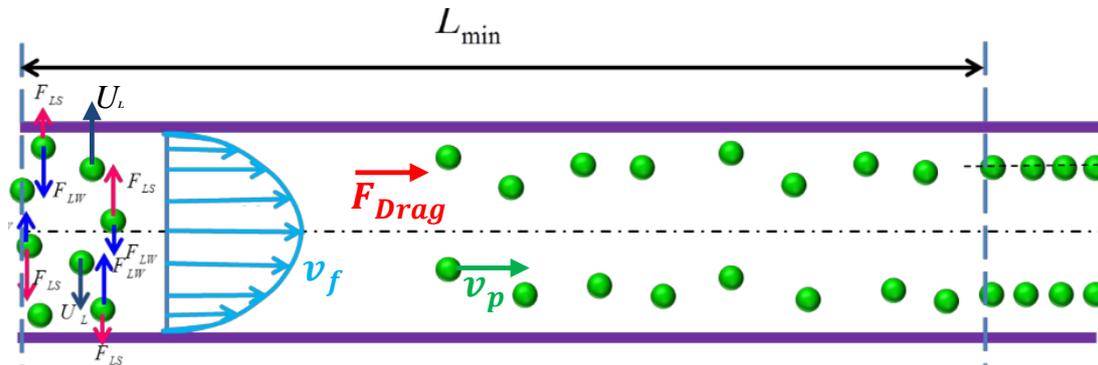


Figure 1. 18 Processus de migration latérale en un canal droit [30]

II Théorie de l'effet d'inertie dans les canaux courbés

II. 1 Force de Dean (flux secondaire)

Lorsqu'une structure de **canal incurvée** comme une spirale ou une sinusoïde est introduite, un autre flux, appelé flux secondaire ou flux de Dean, apparaît, formé par un gradient de pression dans la direction radiale dû à l'effet centrifuge. Les éléments du fluide situés le long de la ligne centrale du canal ont une inertie beaucoup plus élevée que ceux situés près des parois, et ont tendance à se déplacer vers la paroi extérieure du canal.

Dans un canal fermé, afin de respecter le principe de conservation de masse, le fluide relativement stagnant près des parois recircule vers l'intérieur, forme finalement deux tourbillons de circulation symétriques comme le montre la figure 1.19 [57].

Ces tourbillons produisent un flux secondaire perpendiculaire à la direction principale de l'écoulement qui s'appelle écoulement de Dean. Cet écoulement secondaire transmet une deuxième force de traînée qui s'appelle force de Dean F_{SF} et qui est dirigée dans la direction des flux secondaires [58], comme illustré dans la figure 1.20 [45].

Les paramètres qui influencent la force de l'écoulement secondaire dans un canal courbé comprennent le nombre de Dean (De), le nombre de Reynolds (Re), le rapport d'aspect du canal (h/w) et le rapport ($\frac{D_h}{2R}$) entre le diamètre hydraulique du canal (D_h) et le rayon de courbure (R). Le nombre de Dean (De) est une fonction du nombre de Reynolds (Re), du diamètre hydraulique du canal rectangulaire (D_h) et du rayon de courbure du canal R [59] :

$$De = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}} \quad \text{Équation 23}$$

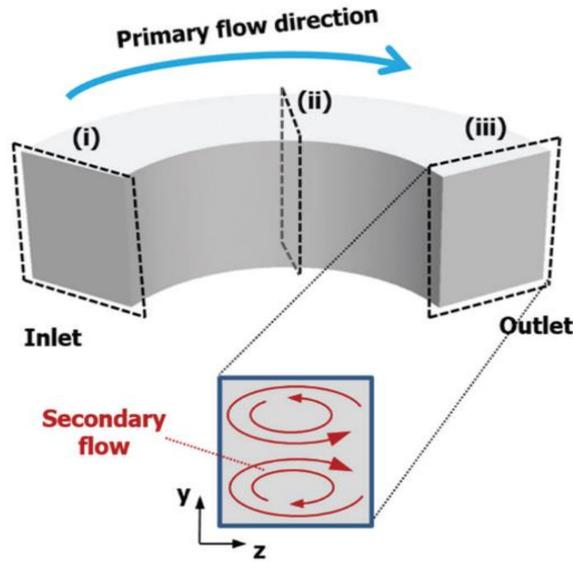


Figure 1. 19 Schéma du flux secondaire [57]

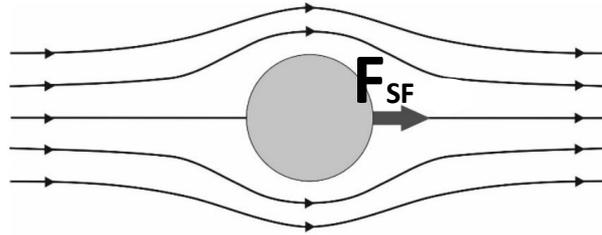


Figure 1. 20 Force de flux secondaire [45]

Les écoulements de Dean apparaissent pour $De > 1$. La vitesse de l'écoulement de Dean (U_{SF}) ainsi que la force de traînée de Dean F_{SF} peuvent être calculées en utilisant l'équation de traînée de Stokes [60], [61], [62][63]:

$$U_{SF} = (v_{fr} - v_{pr}) = \frac{D_e^2 \mu}{\rho_f D_h} = \frac{\rho_f v_f^2 D_h^2}{\mu R} \quad \text{Équation 24}$$

$$F_{SF} = 3\pi\mu a U_{SF} \sim 3\pi\mu a (v_{fr} - v_{pr}) \sim \frac{D_e^2 \mu^2 a}{\rho_f D_h} \sim \frac{\rho_f v_f^2 a D_h^2}{R} \quad \text{Equation 25}$$

où v_{fr} et v_{pr} sont respectivement les vitesses radiales du fluide et des particules. Par rapport à l'effet de migration inertielle dans les canaux droits, le flux de Dean apporte deux avantages principaux : (1) il améliore la pureté de collection à cause de l'ajustement des positions

d'équilibre des particules, (2) il apporte un effet d'agitation qui peut accélérer la vitesse de migration latérale des particules vers leurs positions d'équilibre, ce qui conduit à une réduction de la longueur de canal requise [64], (3) il peut influencer la distribution des positions d'équilibre dans la section transversale du canal, ce qui conduit à une éventuelle séparation particule/cellule en fonction de la taille [43].

II.2 Force centrifuge (inertie de la particule)

L'inertie des particules au niveau des courbures provoque une force centrifuge (F_{Cent}) qui peut être calculée comme suit [65] :

$$F_{Cent} = (\rho_p - \rho_f) \pi a^3 v_{pt}^2 / 6r \quad \text{Équation 26}$$

où ρ_p et v_{pt} sont respectivement la densité et la vitesse tangentielle des particules, r est le rayon de l'orbite des particules (voir figure 1.21).

La force centrifuge envoie vers la paroi extérieure du canal les particules ayant une densité volumique supérieure à celle du liquide porteur ($\rho_p > \rho_f$).

On remarque que F_{SF} et F_{Cent} dépendent toutes les deux de la taille de la particule a , mais F_{SF} est proportionnel à a tandis que F_{Cent} est proportionnel à a^3 , ce qui signifie qu'intuitivement les particules plus lourdes devraient migrer à l'extérieur du canal courbé sous l'effet de cette force.

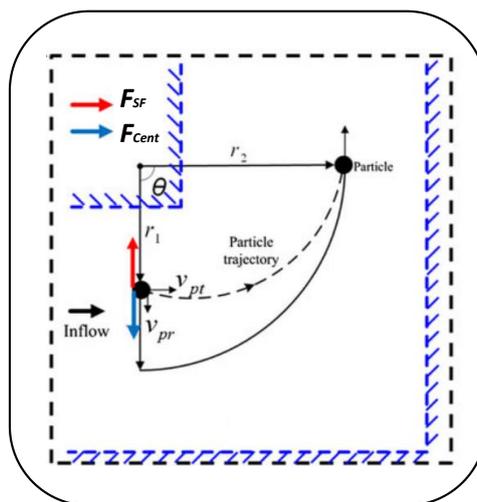


Figure 1. 21 Force centrifuge [66]

II.3 Rapport entre F_{SF} et F_{Cent}

Dans un virage, la force de flux secondaire F_{SF} agit comme une force centripète pour équilibrer la force centrifuge F_{Cent} des particules [30], la trajectoire des particules sera donc une courbe circulaire parfaite. Malheureusement, la force F_{SF} dans une situation réelle ne peut pas toujours équilibrer la force centrifuge F_{Cent} , car à l'entrée du virage ($v_{pr} \approx 0$) (figure 1.22), F_{SF} se dirige dans la même direction que v_{fr} (du coin intérieur vers le coin extérieur), et la direction de F_{Cent} est déterminée par le signe de $(\rho_p - \rho_f)$.

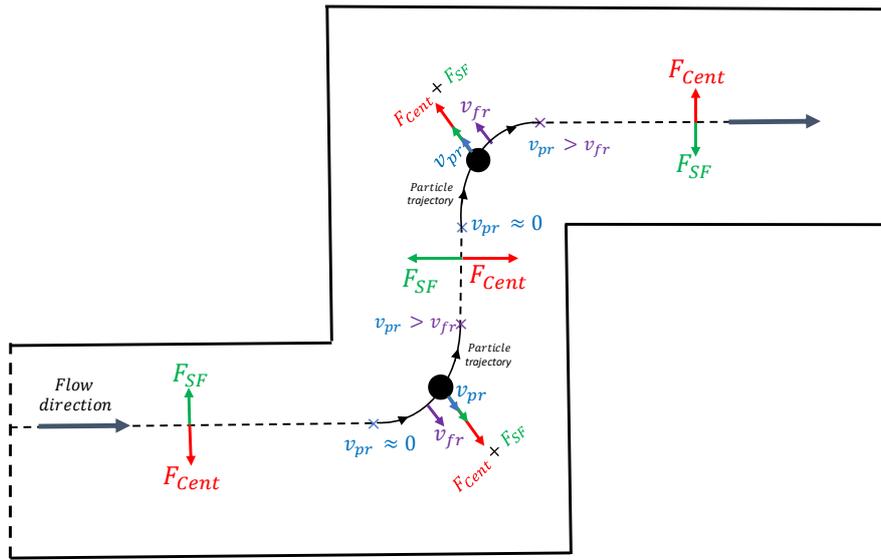


Figure 1. 22 L'effet de la force centrifuge et la force de flux secondaire sur le trajectoire des particules

Dans nos expériences, les particules ayant une densité volumique supérieure à celle du liquide porteur, par conséquent, F_{SF} et F_{Cent} sont orientées dans la même direction, du coin intérieur au coin extérieur. Ainsi, le mouvement des particules dans chaque virage est en fait un mouvement centrifuge [30]. Les particules accélèrent dans la direction radiale vers le coin extérieur jusqu'à ce qu'elles dépassent finalement la vitesse radiale du fluide. À ce moment, la force de flux secondaire F_{SF} change de direction pour entrer de nouveau en compétition avec la force centrifuge.

11.4 Rapport entre F_L et F_{SF}

La compétition entre la force nette de portance et la force de traînée de Dean peut être utilisée pour manipuler le profil de focalisation inertielle des particules et réduire le nombre de positions d'équilibre. Le rapport entre la force nette de portance et la force de traînée de Dean est le rapport de force d'inertie (R_f) [43]:

$$R_f = \frac{a^2 \times R_m}{H^3} \quad \text{Équation 27}$$

où R_m (m) est le plus grand rayon de courbure du système et H (m) est la plus petite dimension du canal. Pour observer la focalisation, les travaux de Di Carlo ont montré que R_f doit être supérieur à 0,04. Dans ces conditions, la force de portance inertielle domine la force de traînée de Dean, tandis que pour des valeurs de R_f inférieures à 0,04, l'effet d'écoulement secondaire est dominant. R_f est donc une fonction importante reliée à la taille des particules. Par conséquent, lorsque deux particules de tailles différentes sont introduites, elles peuvent être séparées sur la base de leurs différentes positions d'équilibre.

En plus, le couplage des forces de portance inertielle (F_L) et de la force de traînée de Dean (F_{SF}) dans un canal incurvé pourrait être utilisé pour modifier la focalisation inertielle et la position d'équilibre des particules.

$(\frac{F_L}{F_{SF}})$ a été exprimé en fonction du rapport de courbure du canal ($\frac{D_h}{2R}$), du rapport d'aspect du canal (h/w), du rapport de blocage des particules (a/D_h) et du nombre de Dean (De) [44], [63]:

$$\frac{F_L}{F_{SF}} \sim \frac{(a/D_h)}{D_e^2 (\frac{D_h}{2R})^{3/4}} \quad \text{Équation 28}$$

Il est important de noter que, sauf sous la condition de $\frac{F_L}{F_{SF}} \approx 1$, les particules seront dominées par les deux forces conjointement. Si $F_L \gg F_{SF}$, les comportements de focalisation sont similaires à ceux des canaux droits. Si $F_L \ll F_{SF}$, les particules vont tourner avec les tourbillons de Dean et aucune focalisation ne pourra être observée.

Di Carlo a indiqué aussi que la force de portance inertielle ne domine les comportements des particules que lorsque le nombre de Reynolds des particules est d'ordre 1. Lorsque $Re_p \ll 1$, l'interaction visqueuse entre le fluide et les particules domine le mouvement des particules dans le canal. Dans cette condition, les particules sont soumises à la traînée visqueuse dominante pour suivre les lignes de courant du fluide. Il a également prouvé que les particules ne pouvaient être focalisées à des positions d'équilibre stables que lorsque leurs tailles sont suffisamment grandes par rapport aux dimensions du canal. Le rapport entre la taille des particules et la dimension du canal pour obtenir la focalisation des particules peut être donné empiriquement comme suit [55]:

$$a/D_h > 0,07 \quad \text{Équation 29}$$

En dessous de cette limite, deux effets liés au rapport a/Dh peuvent entraîner une perte de focalisation inertielle : (1) la longueur minimale requise pour que les particules migrent vers leurs positions d'équilibre inertiel va augmenter [$L_{min} \propto 1/(a/Dh)^3$] ou (2) suite à l'Eq. 28, la traînée de Dean devient beaucoup plus grande que la portance.

II.5 Rapport entre $(F_{cent} + F_{SF})$ et F_L

Le rapport ε entre la somme de $(F_{Cent} + F_{SF})$, et la force de portance inertielle (F_L) détermine les schémas de focalisation des particules dans un microcanal en serpentin. Avec $\varepsilon \gg 1$, la force DC ($F_{Cent} + F_{SF}$) dominera le mouvement des particules, et les particules seront focalisées au centre du canal. En revanche, avec $\varepsilon \ll 1$, la force de portance inertielle dominera le mouvement des particules, elles vont se concentrer sur les deux côtés du canal. Le rapport ε peut être exprimé comme suit [67] :

$$\varepsilon = \frac{F_{cent} + F_{SF}}{F_L} \approx A(\rho_f, D_h, R, \mu)a^{-1}v_f^{0.13} + B(\rho_f, \rho_p, R, D_h)av_f^{0.5} \quad \text{Équation 30}$$

D'après l'équation 30, ε est proportionnel à v_f . Ainsi, ε augmente avec l'augmentation du débit (ou v_f). Cependant, l'équation 30 ne permet toujours pas de déterminer la tendance exacte de ε avec le diamètre des particules a .

III Force élastique

Toutes les forces présentées ci-dessus sont applicables à une particule circulant dans un fluide Newtonien. Un fluide newtonien est un fluide dont la viscosité n'est pas modifiée par la force exercée sur celui-ci (exemple : eau, miel, huile, etc...). En revanche, dans un fluide non newtonien, la viscosité du fluide est modifiée par la force exercée sur celui-ci (sang, ketchup, beurre, mayonnaise, etc...). Dans un fluide non newtonien, en plus des forces de portance et de traînée inertielles, une force élastique est introduite, qui est déterminée par les propriétés rhéologiques du milieu. Comme pour les autres forces, un nombre non dimensionnel appelé nombre de Weissenberg (Wi) est utilisé pour décrire l'élasticité d'un fluide, qui est exprimé par $Wi = \gamma\lambda$, où $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement sur la section transversale du canal qui est exprimé par $\dot{\gamma} = 2v_f/D_h$, et λ est le temps de relaxation. Dans un canal rectangulaire, $Wi = 2v_f\lambda/D_h = 2\lambda Q/wh^2$, où Q est le débit et w et h sont respectivement la largeur et la hauteur du canal [68]. La force élastique résulte de la différence de contrainte normale non uniforme dans le fluide non newtonien. Généralement, dans les solutions viscoélastiques diluées, la force élastique (F_{EL}) peut être exprimée comme suit [69]:

$$F_{EL} \sim a^3 \eta_p \lambda \nabla \dot{\gamma}^2 \quad \text{Équation 31}$$

où η_p est la contribution du polymère à la viscosité de la solution. Un nombre d'élasticité (El) est utilisé pour décrire le rapport entre la force élastique et la force d'inertie, qui est exprimé comme $El = Wi / Re = 2\lambda\mu/\rho_f D_k^2$. El semble être indépendant du débit dans un fluide newtonien (viscosité constante). Cependant, dans les fluides qui s'amincissent ou s'épaississent par cisaillement, El sera liée au débit [69].

Dans un canal de forme carrée, la force élastique poussera les particules vers le centre et les quatre coins du canal. L'équation 31 indique que la force élastique a également un effet d'échelle avec la taille des particules, de sorte qu'elle peut fonctionner avec d'autres forces, y compris les forces de portance et de traînée inertielles pour le tri inertiel dépendant de la taille. Avec l'augmentation du débit, la tendance à migrer vers les coins devient plus faible, et donc les positions d'équilibre varient également avec le débit [70]. En ajustant le débit, la force élastique aurait un effet synergique avec les forces de portance inertielles, en particulier la force induite par la paroi, qui pointe vers le centre du canal. Ainsi, cet effet synergique renforcera les performances de la force de portance pour augmenter R_f jusqu'au niveau permettant une focalisation efficace des particules.

4.1.4.2 Méthodes fondées sur la microfluidique inertielle pour l'isolement des cellules et de microparticules

La microfluidique inertielle est basée sur le mouvement latéral de particules ou de cellules dans un microcanal, mouvement guidé par des forces de portance inertielles passives. Ces forces sont associées au cisaillement du fluide, à la perturbation de l'écoulement près des particules et au gradient de cisaillement [55], [60]. En outre, la courbure du canal et les propriétés rhéologiques du milieu peuvent également créer des forces supplémentaires (par exemple, la force de traînée de Dean et la force élastique) sur les cellules [43]. Ces forces dépendent des propriétés des cellules et du milieu et peuvent être réglées par la géométrie du microcanal et le débit. Puisque les positions d'équilibre dans le canal dépendent des types de cellules (par exemple, bactéries et cellules sanguines), les forces inertielles concentrent les cellules sur différentes lignes de flux permettant ainsi la séparation des cellules. Alors que les systèmes microfluidiques typiques fonctionnent à un faible débit, la focalisation inertielle se produit à un débit relativement élevé (nombre de Reynolds généralement compris entre 1 et 100), ce qui ouvre son champ d'applications à la séparation cellulaire à haut débit [33].

La focalisation inertielle des globules rouges a été démontrée dans des microcanaux droits et courbés [49]. En 2017, Farida *et al.* ont étudié la séparation de bactéries à partir de sang total en utilisant la microfluidique élasto-inertielle (figure 1.23(i)). Ils ont démontré qu'une conception à canaux croisés permettait d'éliminer 80 % des *E. coli* (10^8 UFC/mL) introduits dans du sang total à un débit de $100 \mu\text{L}/\text{min}$ ($240 \text{ mL}/\text{h}$ dans un dispositif à 40 canaux) [71]. Un dispositif microfluidique en spirale basé sur le fractionnement du flux de Dean a permis un taux de récupération supérieur à 65% pour *E. coli* (10^2 cellules/mL) à $\sim 50 \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 1.23(ii)). Le dispositif a également permis la séparation de quatre bactéries différentes de tailles et de formes diverses (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*) à des concentrations cliniquement pertinentes (~ 10 - 50 cellules/mL) [72].

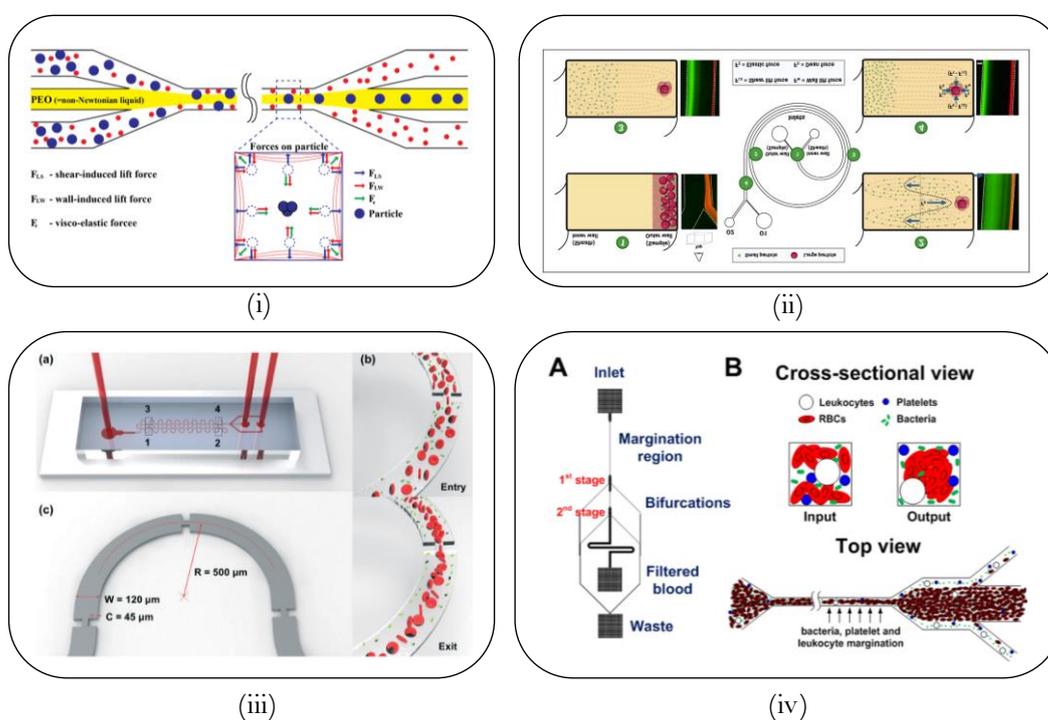


Figure 1. 23 (i) Illustration schématique de la migration et de la séparation de particules par microfluidique élasto-inertielle dans un écoulement à travers un canal droit, développé par Faridi *et al.* [71]. (ii) Illustration schématique du principe de focalisation des particules en fonction de leur taille dans un microcanal en spirale, développé par Iyengar *et al.* [32]. (iii) Dispositif microfluidique inertiel avec une entrée pour l'introduction d'échantillons sans gaine et deux sorties pour la collecte des déchets et des produits, développé par Lu *et al.* [69]. (iv) Illustration schématique du dispositif microfluidique développé pour l'élimination des agents pathogènes du sang, développé par Hou *et al.* [73].

En outre, la fluidique élasto-inertiel peut améliorer la résolution de séparation en introduisant une force élastique à l'aide de fluides non newtoniens [69]. Pour trier les petites bactéries de tailles similaires ($0,5 \mu\text{m}$ à $3 \mu\text{m}$), Lu et ses collègues ont conçu un dispositif microfluidique

élasto-inertiel avec des contractions périodiques le long du canal en spirale (figure 1.23(iii)). Ce dispositif microfluidique élasto-inertiel a permis d'obtenir un taux de récupération de 80 % pour *K. Pneumoniae* et de 60 % pour *S. pneumoniae* à partir de sang dilué à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, avec une charge bactérienne aussi faible que 10^2 UFC/mL [69]. Une autre technique connue est la margination, qui décrit l'accumulation de globules rouges au centre des vaisseaux sanguins et la migration des globules blancs et des plaquettes dans la région proche de la paroi. La ségrégation des globules rouges dans la région à faible cisaillement et des autres cellules dans la région à fort cisaillement est due à la grande déformabilité des globules rouges.

En 2012, Hou et ses collègues ont utilisé ce principe pour concevoir un dispositif microfluidique d'élimination des agents pathogènes et ont obtenu des efficacités d'élimination de 80 % et 90 % respectivement pour *E. coli* et *Saccharomyces cerevisiae* ajoutés dans du sang total à un débit de 16,6 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 1.23(iv)) [73].

De plus, différents modèles de dispositifs en serpentins symétriques et asymétriques ont été utilisés pour la focalisation de microparticules de différentes tailles. En 2007, Di Carlo *et al.* ont été les premiers à explorer les effets sur la focalisation des particules en utilisant un canal ayant une géométrie de serpent in asymétrique. La focalisation de cellules sanguines à un débit de 15 000 cellules/s et la séparation de particules de polystyrène de 4 et 7 μm avec un débit de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ ont pu être réalisées avec leur dispositif (figure 1.24(i)). D'après leur expérience et leur analyse théorique, la condition de focalisation et de migration des particules dans un canal était : $a/D_h > 0,07$ [55].

En plus de la structure en serpent in asymétrique, Zhang *et al.* [66] ont développé un canal carré serpent in symétrique pour réaliser la focalisation des particules. Trois modèles différents de focalisation des particules ont été trouvés dans leur canal carré : (1) une région dominée par la force de portance inertielle avec des bandes de focalisation à deux côtés, (2) une région de transition avec une large bande centrale unique de focalisation, et (3) une région dominée par la force de traînée de Dean et la force centrifuge avec une seule bande de focalisation au centre du canal. Grâce à ces trois modèles, le canal à onde carrée a également pu être appliqué pour séparer les particules en fonction des positions d'équilibre différentiel basées sur la taille (figure 1.24(ii)) [67]. Les résultats expérimentaux sur la séparation de particules de polystyrène de 3 et 10 μm ont montré que des efficacités de séparation supérieures à 90 % (97,5 % pour les particules de 10 μm et 92,8 % pour les particules de 3 μm) pouvaient être atteintes [67]. Nous reviendrons plus loin dans le chapitre 4 sur ces résultats que nous pourrions comparer avec nos mesures expérimentales.

L'extraction du plasma à partir des cellules sanguines diluées a également été réalisée à l'aide de leur dispositif en éliminant 100% des cellules sanguines. Le rendement de collecte du plasma a atteint 46 % à un débit de 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 1.24(iii)) [7].

D'autres études ont porté sur la focalisation élasto-inertielle des particules/cellules dans des canaux serpentinaux à ondes carrées [74]. Yuan *et al.* ont réussi à focaliser des particules de 13 μm dans un fluide viscoélastique à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 1.24(iv)).

D'autres études ont été réalisées par Lu *et al.* en 2020 sur le tri inertiel dans un microcanal en serpentin. Les auteurs ont réussi à séparer les particules de 5,5 μm et 6,0 μm avec un taux de récupération supérieur à 80 % et une pureté supérieure à 92 %, démontrant un tri inertiel basé sur la taille à une résolution submicronique (c'est-à-dire 0,5 μm) [75]. De plus, leur dispositif a permis de purifier les espèces de *Candida* à partir d'un échantillon de sang total améliorant ainsi le diagnostic moléculaire de l'infection à *Candida* dans le sang (figure 1.25(i)).

En 2021, Rodriguez-Mateos *et al.* ont étudié la manipulation inertielle microfluidique de petites particules et cellules (1-10 μm) dans des canaux de verre serpentinaux asymétriques courbés gravés à différentes profondeurs. Ils ont réussi à récupérer 54% d'*E. coli* en éliminant 97% des globules rouges du sang dilué 50 fois à un débit de 0,7mL/min (figure 1.25(ii)) [76].

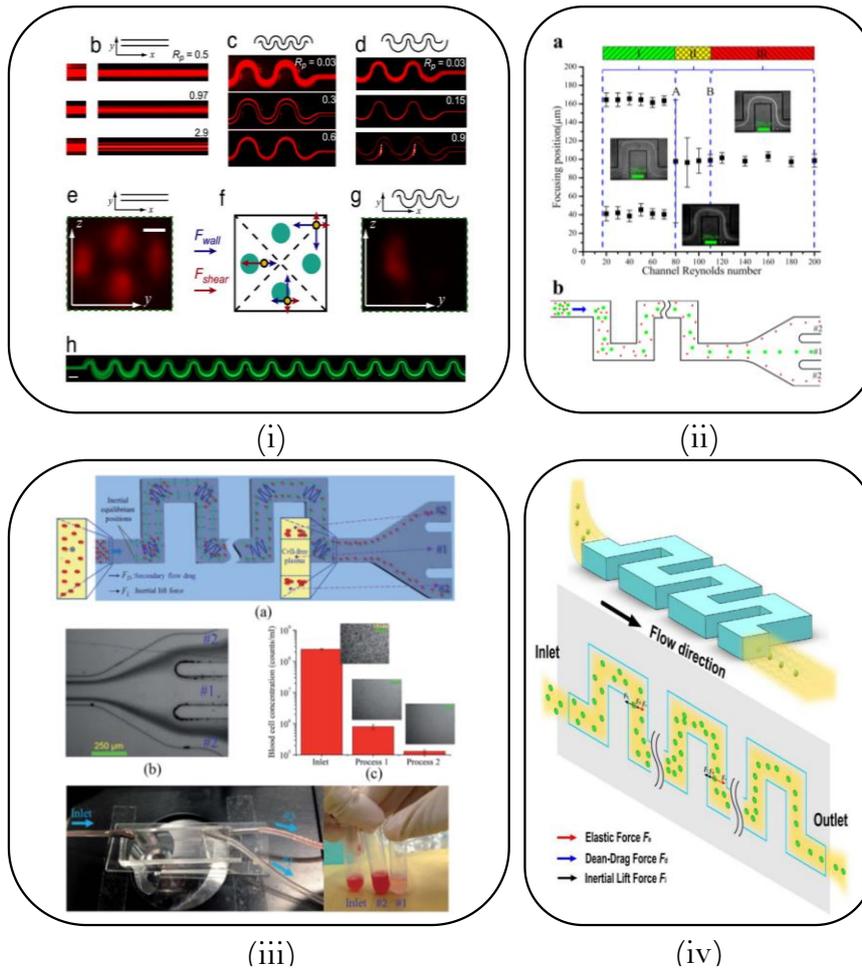


Figure 1. 24 (i) Trajectoires de particules fluorescentes capturées dans le microcanal serpentin symétrique et asymétrique, développé par Di Carlo et al. [55]. (ii) Illustration schématique du concept de séparation basée sur la taille des particules dans un canal en serpentin, développé par Zhang et al. [67]. (iii) Illustration schématique de l'extraction du plasma dans le canal serpentin, développé par Zhang et al. [7]. (iv) Vue schématique de la focalisation élasto-inertielle des particules couplées au flux de Dean dans les canaux serpents, développé par Yuan et al. [74].

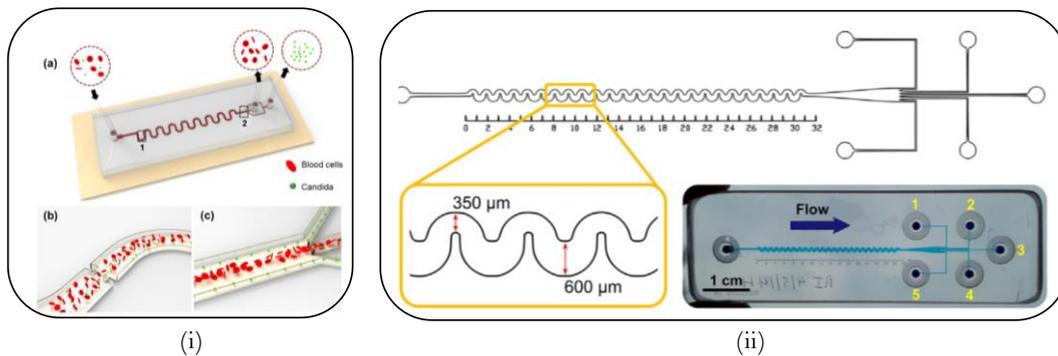


Figure 1. 25 (i) Illustration schématique du dispositif microfluidique de tri cellulaire [75]. (ii) Illustration schématique du dispositif microfluidique de tri cellulaire dans des canaux courbés en verre gravés à différentes profondeurs [76].

En conclusion, des canaux microfluidiques avec différents types de géométries droites et de géométries courbées ont été employés pour la focalisation inertielle des particules et des

cellules, notamment des canaux droits [71], des spirales [32], des canaux courbés en serpentins symétriques et asymétriques [55], [67] et des combinaisons de spirales et de courbes serpentines asymétriques [76]. Bien que les dispositifs en spirale soient le type de géométrie courbée le plus couramment utilisé, un inconvénient majeur des canaux en spirale et à courbure unique, qui ne tournent que dans une seule direction, est la difficulté d'en disposer un grand nombre en parallèle sur un seul substrat [77]. Les canaux courbés en serpentins avec des directions alternées sont plus facilement parallélisables et nécessitent moins de distance linéaire que les canaux droits [43].

4.2 Déplétion des cellules sanguines par lyse chimique et/ou choc osmotique

La déplétion des cellules sanguines est une autre stratégie importante pour l'extraction d'agents pathogènes du sang complet. Cette technique réduit la complexité en composition de l'échantillon tout en améliorant l'efficacité des approches d'enrichissement en aval. Plusieurs mécanismes de lyse sont décrits dans la littérature, comme la lyse osmotique en milieu hypotonique et la lyse induite par des tensioactifs [2], [32], [78], [79].

Les tensioactifs sont le plus souvent utilisés pour lyser les cellules de mammifères. Ces tensioactifs sont assez efficaces sur les cellules sanguines, c'est-à-dire sur les globules rouges et blancs. En 2015, Zelenin *et al.* ont rapporté un système de préparation d'échantillons sur puce microfluidique pour la lyse rapide et sélective des cellules sanguines permettant l'extraction de bactéries viables à partir du lysat sanguin. Dans son article, il démontre que l'utilisation du tensioactif seul (la saponine) ne permet pas de lyser la totalité des cellules sanguines. En conséquence, il propose un protocole en deux étapes : une première étape avec un détergent doux, la saponine, qui permet la lyse de la plupart des cellules sanguines, puis un choc osmotique obtenu par mise en contact du fluide biologique avec de l'eau déionisée est effectué, ce qui élimine les globules blancs restants et permet de récupérer les bactéries 100% viables [2].

Zelenin *et al.* ont montré que la saponine combinée au choc osmotique détruit spécifiquement les cellules sanguines alors que les bactéries restent viables (figure 1.26). La saponine à 1 % m/v était optimale, car elle permettait une lyse complète des cellules sanguines sans affecter la viabilité des bactéries. Si les bactéries ne sont pas endommagées par ce protocole, cela provient du fait que les cellules bactériennes possèdent plusieurs couches externes qui enferment le contenu cellulaire. En effet, il faudrait d'abord briser la paroi cellulaire externe pour rompre la membrane cellulaire interne. Le protocole proposé par Zelenin est donc très

intéressant, car il semble efficace pour lyser des cellules simples comme les globules rouges, mais, sans action majeure, sur les parois multicouches des bactéries. Ce point très important sera rediscuté plus loin dans le chapitre 3.

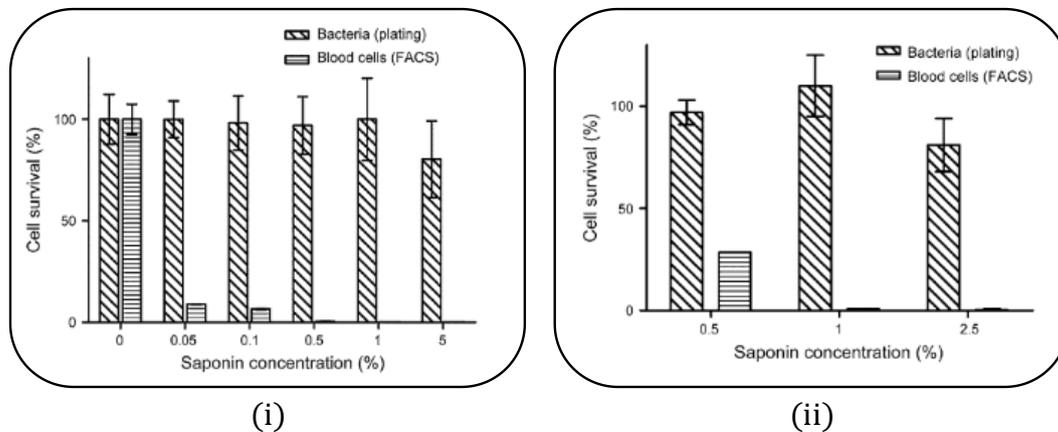


Figure 1. 26 Pourcentage des cellules sanguines et des bactéries viables en fonction de la concentration en saponine (i) hors puce et (ii) sur puce

Dans la section suivante, nous allons présenter l'influence de l'osmolarité du milieu sur les cellules sanguines et/ou bactéries. De plus, nous allons présenter les tensioactifs utilisés pour la lyse des cellules sanguines et leurs mécanismes d'hémolyse.

4.2.1 L'osmolarité

Les membranes cellulaires séparent l'intérieur de la cellule (le cytoplasme) du milieu extérieur et régulent les concentrations ioniques intracellulaires. Si la concentration saline environnante change brusquement, créant une différence de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, l'eau peut passer à travers la membrane par osmose. La régulation précise de ces concentrations est cruciale pour un fonctionnement cellulaire optimal. [6].

La détermination de l'osmolarité (équation 12) est possible en mesurant la concentration de solutés dans un milieu. Cette grandeur physiologique cruciale régule le volume des cellules et un manque de contrôle adéquat peut causer des conséquences graves, voire la mort cellulaire.

$$\text{Osmolarité [mOsm.L}^{-1}\text{]} = \text{Concentration [mmol.L}^{-1}\text{]} \times \text{nb de particules dissociables} \quad \text{Équation 32}$$

Par exemple, la concentration molaire d'une solution de NaCl à 0.9% m/v est égale à 145 mmol.L⁻¹, et son osmolarité vaut 145 x 2 (Na⁺, Cl⁻) = 290 mOsm.L⁻¹. L'osmolarité du plasma est d'environ 310 mOsm.L⁻¹, principalement due à la présence d'ions chlore et sodium (voir tableau 1.3)

ions	concentration extracellulaire (plasma) [mmol.L ⁻¹]
Na ⁺	136-145
Cl ⁻	96-113
K ⁺	3.5-5.2
PO ₄ ³⁻	0.87-1.45
Ca ²⁺	2.2-2.6
Mg ²⁺	0.74-1.07

Tableau 1. 3 Liste des principaux ions et de leur concentration dans le plasma [6]

Lorsqu'une membrane semi-perméable sépare deux milieux avec une différence d'osmolarité, la pression osmotique fera migrer l'eau du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré, en équilibrant les concentrations de soluté. Ce mouvement d'eau à travers la membrane cellulaire affecte le volume et la forme des cellules, qui restent stables si le volume cellulaire ne change pas, ce qui correspond à un milieu extracellulaire isotonique. Dans les milieux hypertoniques, le volume cellulaire diminue à cause de la sortie d'eau de l'intérieur vers l'extérieur, tandis que dans les milieux hypotoniques, le volume cellulaire augmente avec l'entrée d'eau de l'extérieur vers l'intérieur. Ce phénomène de changement de volume cellulaire est facilement observable, notamment pour les globules rouges en suspension dans différents milieux, comme le montre la figure 1.27. Ces principes sont applicables à tous les environnements physiologiques du corps humain.

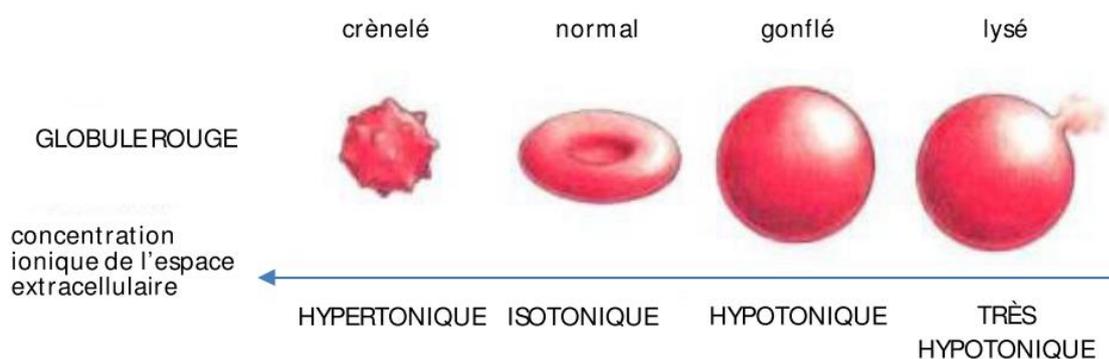


Figure 1. 27 Evolution de la forme d'un globule rouge en fonction de l'osmolarité du milieu extracellulaire [6]

Ainsi, la modification de la pression osmotique du milieu extracellulaire permet de modifier la composition interne de la cellule, notamment lorsque les modifications sont trop brusques pour que les échanges transmembranaires maintiennent stables les concentrations intracellulaires [6].

Dans ma thèse, nous allons nous intéresser à l'effet d'un milieu très hypotonique sur les cellules sanguines et les bactéries, pour comprendre dans quelle mesure un choc osmotique peut lyser les cellules sanguines en gardant les bactéries viables.

4.2.2 Mécanismes de lyse des érythrocytes par les agents tensioactifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles (monomères), c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile ou hydrophobe (qui retient les matières grasses) est apolaire, l'autre hydrophile (miscible dans l'eau) est polaire.

La membrane cellulaire est une couche bi-lipidique composée de molécules hydrophobes et hydrophiles (voir figure 1.2). Elle est composée (en poids) de 52% de protéines, 40% de lipides et 8% de glucides comme les glycoprotéines [80].

Les tensioactifs peuvent être utilisés pour désagréger les membranes cellulaires. Ils sont capables de perturber les interactions lipide-lipide, lipide-protéine et protéine-protéine.

La pénétration des tensioactifs induit une modification de l'organisation des lipides, l'arrangement des protéines intégrales et plus généralement l'équilibre cellulaire. Toutes ces altérations cellulaires peuvent conduire à la rupture de la membrane, appelée lyse cellulaire.

La lyse cellulaire par les tensioactifs peut se produire à la fois par voie osmotique et par solubilisation avec formation de micelles mixtes en fonction de la concentration en tensioactifs.

4.2.2.1 Lyse par voie osmotique

Le mécanisme de lyse osmotique induit par les tensioactifs est similaire à l'hémolyse en milieu hypotonique qui s'explique principalement par l'entrée d'eau dans la cellule afin de conserver les concentrations intracellulaires stables.

4.2.2.2 Solubilisation membranaire

Les tensioactifs s'insèrent dans la membrane jusqu'à une concentration limite de saturation (C_{sat}) correspondant au début de la lyse. Cet échange continu entre la membrane érythrocytaire et les monomères tensioactifs des micelles peut conduire à la solubilisation de la membrane cellulaire avec la formation de micelles mixtes lipides-protéines-surfactants et donc l'élimination des composants de la membrane érythrocytaire (figure 1.28)[81], [82].

Le fait qu'une bactérie gram négative contienne deux membranes (interne et externe) nécessite une concentration de saturation C_{sat} plus élevée que celle des cellules sanguines qui contiennent une seule membrane cytoplasmique.

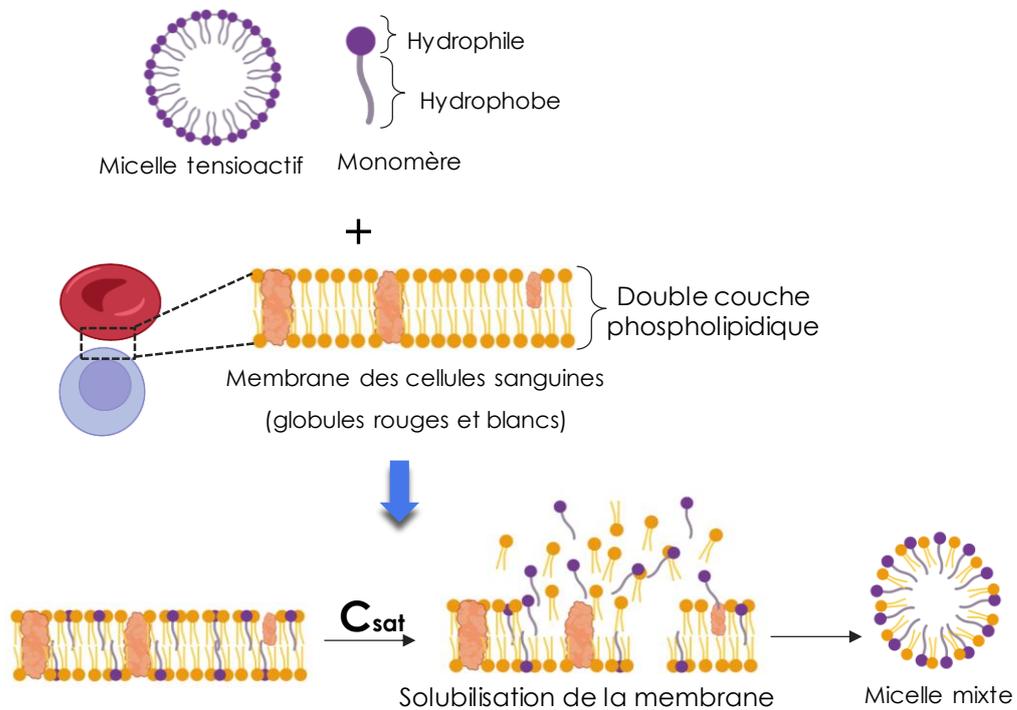


Figure 1. 28 Mécanismes de solubilisation membranaire

Dans l'ensemble, il existe certains compromis entre le débit accessible, le taux de récupération et la pureté des solutions extraites pour chaque technique de préparation des échantillons. Par exemple, la microfluidique inertielle permet de travailler à un débit relativement élevé, tandis que la diélectrophorèse permet quant à elle une grande sélectivité de séparation entre les différents types de cellules extraites.

En raison de l'écart important de quantité entre les agents pathogènes (100 bactéries/mL) et les échantillons de sang (10^9 cellules/mL), plusieurs méthodes peuvent être combinées pour atteindre la fiabilité requise dans un diagnostic clinique. Les modules de préparation des échantillons devraient également être combinés avec des techniques de détection et de caractérisation microfluidiques pour un diagnostic complet des bactériémies. Dans ma thèse, nous avons combiné deux techniques sur une même plateforme microfluidique afin de faciliter l'extraction d'agents pathogènes du sang : 1) un module de lyse des cellules sanguines par un détergent associé à un choc osmotique, et 2) un module de tri des bactéries dans un canal serpentin à ondes carré basé sur la microfluidique inertielle.

5 Techniques de détection d'ADN en électrochimie

Dans la section suivante, je vous présente les techniques de détection d'ADN utilisées en électrochimie. Dans ma thèse, nous avons utilisé l'électrochimie comme une méthode de détection d'espèces chimiques. Dans notre cas, nous cherchons à détecter les gènes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli*, principale bactérie responsable de la septicémie.

L'électrochimie est une discipline qui étudie la relation entre les réactions chimiques et le passage de courant électrique [83][84]. Ses domaines d'application sont très larges : 1) génération d'énergie électrique à partir de réactions chimiques (piles et accumulateurs), 2) exécution de réactions chimiques à partir d'énergie électrique (électrolyse), 3) détection et dosage d'espèces chimiques (4) détermination de mécanismes et de cinétique réactionnels (électrochimie organique, corrosion), 5) fabrication de dispositifs (batteries, capteurs), etc. [85].

La microfluidique permet d'intégrer sur une seule plateforme toutes les étapes de la chaîne d'analyse en réduisant 1) les quantités et les coûts de réactifs, 2) le risque de contamination et 3) le temps de diagnostic [17]. Grâce à ses propriétés, les dispositifs microfluidiques sont largement utilisés dans le domaine de la détection électrochimique des acides nucléiques [86], [87].

5.1 Biocapteur microfluidique pour la détection électrochimique d'acides nucléiques

Au cours des dernières années, différents types de biocapteurs électrochimiques basés sur la reconnaissance des acides nucléiques ont été développés [88], [89]. Ces biocapteurs typiques combinent un biorécepteur et un transducteur. Le biorécepteur interagit spécifiquement avec l'analyte cible, et le transducteur convertit cette interaction en un signal électrique.

Selon les biorécepteurs, les biocapteurs peuvent être classés en 1) biocapteurs d'anticorps, 2) biocapteurs d'ADN, 3) biocapteurs enzymatiques et 4) biocapteurs des cellules entières [90]. Selon les transducteurs, les biocapteurs peuvent être classés en 1) biocapteur électrochimique, 2) biocapteur piézoélectrique, 3) biocapteur calorimétrique et 4) biocapteur optique. Dans le cadre de cette étude et parmi ces différents biocapteurs, nous avons développé un biocapteur électrochimique à ADN où les événements d'hybridation sont convertis en un signal électrique.

Les principaux avantages du biocapteur électrochimique d'ADN par rapport à d'autres capteurs d'ADN sont les suivants : il peut être miniaturisé, compatible avec la technique de microfabrication, nécessite une instrumentation simple, offre une sensibilité et une sélectivité remarquables, réagit rapidement, est facile à utiliser et à transporter, il nécessite une alimentation minimale et sa production est peu coûteuse [91][92].

5.1.1 Principe de base des biocapteurs électrochimiques à ADN

En électrochimie, pour détecter des séquences d'acides nucléiques cibles, le récepteur biologique généralement est la séquence d'ADN sonde, qui est complémentaire à la séquence cible [93]. Les transducteurs les plus courants sont des électrodes modifiées.

Les montages électrochimiques utilisés pour les biocapteurs électrochimiques peuvent être classés en deux catégories : 1) les montages à 3 électrodes (travail, référence et auxiliaire) et 2) les montages à 2 électrodes (travail et référence). Les électrodes de travail (WE) sont des électrodes idéalement polarisables comme les métaux nobles (le platine, le palladium, l'or, etc..) qui ne s'oxydent pas dans l'eau (quel que soit le pH) et qui ont une conductivité électronique élevée [85]. Dans notre cas, nous avons utilisé le platine comme électrode de travail (moins critique que l'or car il a une stabilité électrochimique plus importante).

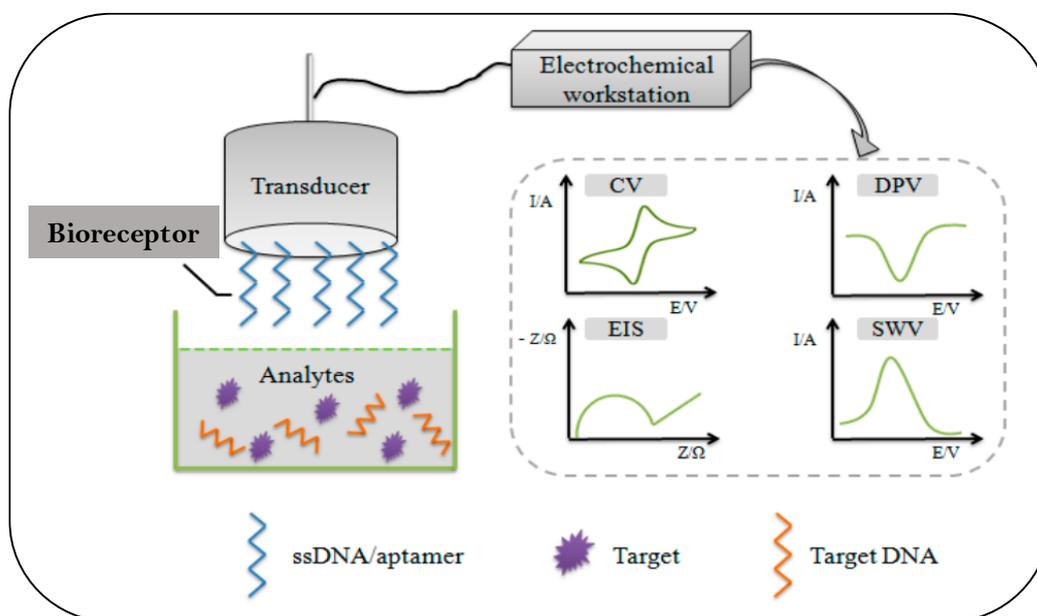


Figure 1. 29 Diagramme schématisé des biocapteurs électrochimiques d'ADN [90].

La réaction entre la sonde et la cible s'effectue à la surface de l'électrode de travail (l'électrode en platine). Pour la détection d'une séquence d'acide nucléique cible, les biocapteurs électrochimiques sont constitués de trois étapes clés successives : (1) Immobilisation d'une séquence d'ADN sonde, complémentaire à la séquence cible ; (2) Hybridation de la séquence

d'acide nucléique cible à la sonde ; (3) Mesure électrochimique pour la détection de l'hybridation. Le schéma de base d'un biocapteur électrochimique d'ADN est présenté dans la figure 1.29 [90].

5.2 Méthodes d'immobilisation de la séquence d'ADN sonde

Les propriétés des capteurs électrochimiques d'ADN, notamment la sensibilité, la spécificité et la durée de vie, sont largement liées à l'immobilisation des biorécepteurs à la surface des électrodes. Par conséquent, l'exigence la plus fondamentale pour la méthode d'immobilisation est qu'elle ne doit ni détruire l'activité biologique du biorécepteur ni affecter l'interaction entre le biorécepteur et la cible. Le tableau 1.4 décrit les principes, les avantages et les inconvénients de quatre méthodes de base d'immobilisation de l'ADN [90], [91], [94].

Méthodes	Principe	Evaluation
Voie physique: Adsorption	Le squelette de l'ADN est chargé négativement, en modifiant la surface des électrodes avec des substances chargées positivement ou en appliquant un potentiel positif, l'ADN peut être absorbé sur les électrodes.	Simple, ne nécessitant pas de réactifs chimiques ni de modification des sondes d'ADN. Faible efficacité d'hybridation de l'ADN
Voie chimique : greffage covalent	L'ADN est immobilisé à la surface des électrodes par la formation de liaisons covalentes telles que les liaisons amides, les liaisons esters, les liaisons éthers, les liaisons Thiols (Au-SH et Pt-SH etc..)	Structure flexible, haute efficacité de l'immobilisation et de l'hybridation de l'ADN, mais avec la nécessité de réactifs chimiques, et avec la possibilité d'une adsorption non spécifique.
Liaison par affinité	L'avidine est d'abord adsorbée à la surface de l'électrode par liaison covalente ou par adsorption électrostatique, puis l'ADN modifié à la biotine est immobilisé sur l'électrode par interaction d'affinité entre la biotine et l'avidine.	La méthode est simple, stable et résistante aux conditions extrêmes de température, du pH, des détergents dénaturés et des solvants organiques.
Voie électrochimique : greffage électrochimique	Le greffage électrochimique consiste à polariser sous champ électrique l'électrode de travail (transducteur) en présence des molécules que l'on souhaite greffer (éthylène diamine ou sels du diazonium), ce qui génère l'oxydation ou la réduction de la molécule à base de solution ou un groupe fonctionnel à base de surface	cette technique offre l'opportunité de la sélectivité du greffage et aussi la possibilité de greffer une ou multi couche des molécules.

Tableau 1. 4 Méthodes courantes d'immobilisation de l'ADN [91], [27].

Parmi ces différentes méthodes d'immobilisation de l'ADN, la méthode d'adsorption est la plus simple et ne nécessite pas de réactifs chimiques ni de modification de l'ADN. Le squelette phosphate de l'ADN est chargé négativement, ce qui permet à l'ADN d'être immobilisé en modifiant une substance chargée positivement sur la surface de l'électrode [95]. Ces substances comprennent généralement le chitosan, les films polymères cationiques, etc. En

plus, des études ont montré que l'application d'un potentiel positif à travers les électrodes entraîne une immobilisation plus stable de l'ADN. Vijayalakshmi Velusamy *et al.* [96] ont rapporté un biocapteur électrochimique d'ADN pour la détection de l'ADN de *Bacillus cereus*. La surface de l'électrode en or a été modifiée avec du polypyrrole (PPy) pour immobiliser l'ADN, puis un potentiel fixe de 0,8 V pendant 600 s a été appliqué pour améliorer l'efficacité et la stabilité de l'immobilisation.

En plus de la méthode d'adsorption, la liaison covalente est une méthode très courante pour l'immobilisation de l'ADN sur les surfaces des électrodes. Mahmoud Amouzadeh Tabrizi *et al.* [97] ont développé un biocapteur électrochimique d'ADN basé sur des électrodes de carbone vitreux nano poreux pour détecter les séquences d'ADN de *Salmonella*. L'ADN sonde modifié par une fonction amine (NH_2) a d'abord été lié de manière covalente avec le groupe carboxylique (COOH) sur le GCE (Glassy Carbon Electrodes) nano poreux. Ensuite, l'ADN cible s'est hybridé avec l'ADN sonde. Les mesures électrochimiques de la détection ont été obtenues par les techniques CV (Cyclic Voltammetry) et EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy). La limite de détection de leur biocapteur était de 2,1 pM et 0,15 pM, respectivement.

En outre, l'auto-assemblage est une autre méthode courante de liaison covalente pour l'immobilisation de l'ADN sur la surface de l'électrode. Marie-Charlotte Horny *et al.* [98] (**notre équipe Biosys**) ont développé un biocapteur électrochimique à ADN pour détecter la cible ADN qui imite l'acide micro-ribonucléique 122 (miRNA122) spécifique de lésions précoces du foie. Leur biocapteur a été composé d'une paire d'électrode en or : une grande contre- électrode (ou auxiliaire) et une petite électrode de travail. L'ADN sonde modifié à l'extrémité par une fonction thiol a d'abord été lié à l'or par des liaisons Au-S. Ensuite, l'ADN cible s'est hybridé avec l'ADN sonde.

Ils ont réussi avec leur biocapteur à détecter une séquence de microARN complémentaire en 30 minutes avec une limite de sensibilité de 10^{-18} M.

La spécificité de ce biocapteur a été améliorée par Claire poujouly *et al.* [99] grâce à l'ajout de bleu de méthylène dans l'électrolyte, ce qui leur a permis de distinguer l'hybridation du brin parfaitement complémentaire, de l'hybridation d'un brin avec un mismatch, quel que soit son emplacement dans le brin.

Zahra Izadi *et al.* [100] ont développé un biocapteur électrochimique à ADN pour détecter *Bacillus cereus* dans le lait. Leur biocapteur est composé d'une électrode en graphite modifiée

avec des nanoparticules d'or. L'ADN sonde a été lié avec les nanoparticules d'or par des liaisons Au-S. La sensibilité de leur biocapteur de *B. cereus* est de l'ordre de 100 CFU/mL.

E. Sheikhzadeh *et al.* [101] ont établi un biocapteur impédimétrique pour détecter *S. Typhimurium* dans le jus de pomme. Les sondes d'ADNs ont été modifiées à l'extrémité 5' par un groupement amine avant leur immobilisation sur la surface de l'électrode. La limite de détection était de 3 CFU/mL.

L'une des méthodes les plus utiles pour immobiliser efficacement l'ADN sur les électrodes est la liaison par affinité. Cette méthode dépend d'une affinité spécifique entre l'avidine et la biotine. Cependant, la limite de détection du biocapteur électrochimique à ADN établie par cette méthode est inférieure par rapport à d'autres méthodes [101].

L'immobilisation d'ADN par voie électrochimique est une des méthodes les plus courantes dans le domaine de la détection électrochimique. Bacem Zribi *et al.* en 2016 [27] ont développé des capteurs électrochimiques basés sur des nanotubes de carbone associés à du ferrocène comme marqueur redox (nanotube de carbone (CNT)/ferrocène) pour la détection de maladies infectieuses (Tuberculose et Hépatite C). Une étape d'oxydation électrochimique de l'éthylène diamine a été effectuée afin d'électro-greffer l'amine sur la surface des nanomatériaux carbonés et créer une liaison entre le ferrocène et les CNTs. La dernière étape repose sur l'immobilisation de l'ADNs sur le ferrocène. La sensibilité de leur biocapteur était de l'ordre de femto-molaire.

Au cours de ma thèse, deux méthodes d'immobilisation ont été mises en œuvre : 1) immobilisation par voie électrochimique (récemment breveté par notre équipe Biosys, n° DI 2021-0031, FR 2112764) et 2) immobilisation par voie chimique (liaisons Pt-Thiols, toujours en cours d'optimisation).

Chapitre 2 – Procédés de fabrication des dispositifs

La première partie de ce chapitre expose le protocole de fabrication du premier module dédié à l'extraction des bactéries du sang. Cette partie inclut la description du procédé de réalisation du dispositif en PDMS et les méthodes de scellement. La réalisation d'un dispositif microfluidique se fait en deux étapes : la réalisation du moule puis la fabrication du dispositif en PDMS.

La deuxième partie explique les protocoles utilisés pour la fabrication du module de détection électrochimique. Cette partie inclut la description des deux procédés mis en œuvre : le premier aboutissant à l'intégration d'électrodes en Pt sur verre, et le second, qui concerne la réalisation des connectiques des puces.

1 Fabrication du module 1 : dédié à l'extraction des bactéries du sang

1.1 Réalisation des moules par photolithographie

La photolithographie consiste à illuminer l'échantillon par un rayonnement dans le domaine des UV à travers un masque transparent, contenant les motifs que l'on souhaite transférer. La figure 2.1 décrit toutes les étapes de lithographie qui ont été mises en œuvre pour microstructurer les microcanaux sur la surface des substrats.

La photolithographie comprend 3 principales étapes : l'enrésinement, l'insolation sous rayonnement UV et le développement de la résine insolée. L'enrésinement consiste à étaler au préalable à l'aide de forces centrifuges une petite quantité de résine photosensible SU-8 (résine négative) sur un substrat de silicium de façon uniforme et contrôlée. L'insolation consiste à l'exposition de certaines zones de la résine photosensible à un rayonnement ultraviolet en masquant la lumière au moyen d'un masque. Le masque UV est en général constitué d'une lame de quartz transparent et porteuse des motifs absorbants (le plus souvent les motifs sont en chrome). Dans notre application, nous avons utilisé une résine photosensible négative (SU-8), ce qui veut dire que les zones de la résine irradiées réticulent et restent sur le substrat en silicium après développement. A noter que la résine est un polymère, elle doit donc être chauffée pour finaliser la réticulation. Procéder à un recuit de la résine avant l'exposition UV (que l'on appelle pré-recuit) et à un recuit après l'exposition UV (que l'on appelle post-recuit) va permettre, de plus, d'évaporer le solvant résiduel présent dans la résine qui peut être gênant pour la suite des opérations. Par la suite, le développement consiste à retirer la résine photosensible qui a été non irradiée.

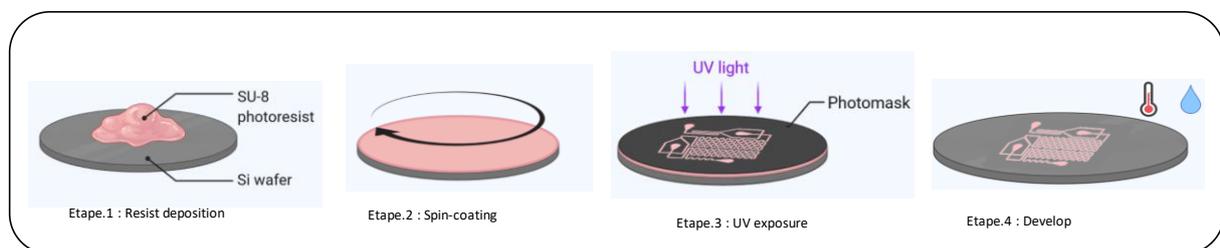


Figure 2. 1 Etapes de fabrication des moules en utilisant la technique de la photolithographie UV.

Les différentes étapes du protocole de photolithographie UV, schématisées sur la figure 2.1, sont décrites en détail ci-dessous :

1. La première étape consiste à nettoyer le substrat avec des solvants. Le substrat en silicium est en effet d'abord rincé avec de l'isopropanol pendant 1 min. Il est ensuite séché à l'azote gazeux

puis rincé avec de l'acétone, et enfin séché une deuxième fois à l'azote gazeux. Cette étape sert à éliminer les résidus sur le substrat.

2. La deuxième étape est le dépôt d'un film de résine photosensible sur le substrat en silicium par un procédé d'enduction centrifuge (voir l'étape 1 de la figure 2.1). Il existe trois types de résine photosensible : positive, négative et réversible. La résine photosensible positive est celle, où les zones irradiées seront retirées dans le développeur, générant ainsi la même géométrie de motifs que celle du masque. La résine photosensible négative est celle où les zones irradiées se réticulent et deviennent insolubles dans le développeur. Tandis que la résine photosensible réversible peut changer sa polarité après un recuit ou une deuxième exposition UV. Pour notre application, nous utilisons une résine négative SU-8, qui permet de réaliser des motifs d'une épaisseur comprise entre quelques micromètres et quelques centaines de micromètres. Avant l'enrésinement, et afin d'améliorer l'adhérence de la résine sur le substrat en silicium, ce dernier est déshydraté sur une plaque chauffante pendant 10 min à une température de 110°C. La résine SU-8 est versée au centre jusqu'au 2/3 du substrat en silicium. Le substrat a été préalablement posé sur une tournette, et fixé en place en appliquant un vide. Le mouvement rotationnel de la tournette va permettre de former une fine couche de résine photosensible sur le substrat en silicium par un procédé d'enduction centrifuge. La vitesse, l'accélération et la durée de rotation de la tournette, sont les paramètres qui déterminent l'épaisseur de la résine. Cette technique est appelée « spin-coating » (voir l'étape 2 de la figure 2.1). Les épaisseurs de résine retenues pour nos dispositifs sont 20, 40 et 100 μm . Ces épaisseurs correspondent à la hauteur des microcanaux. Les microcanaux d'une hauteur de 20 μm ont été réalisés avec une résine SU-8 2010 (gamme d'épaisseur entre 10 et 20 μm) [102]. Les microcanaux d'une hauteur de 40 μm ont été réalisés avec une résine SU-8 3050 (gamme d'épaisseur entre 35 et 110 μm [103]), et les micro canaux d'une hauteur de 100 μm ont été réalisés avec une résine SU-8 2050 (gamme d'épaisseur entre 40 et 170 μm [104]).

Les paramètres du protocole de lithographie UV (paramètres de la tournette, temps de pré-cuisson, temps d'exposition UV, temps de cuisson et temps de révélation) utilisés pour chaque réalisation de moule sont donnés dans le tableau 2.1. La fabrication des moules avec des épaisseurs de résine importantes (entre 80 et 120 μm) peut créer des effets de bords qui provoquent une surépaisseur sur la partie externe de la moule. Cela peut induire un mauvais contact entre le masque et la résine SU-8 et par conséquent réduire la résolution des motifs au moment de l'exposition UV. Afin d'éviter ces effets, un temps de relaxation de 30 à 45 min entre le dépôt de résine et le pré-recuit sur une surface horizontale permet de diminuer significativement les effets de bords et d'homogénéiser l'épaisseur de résine sur toute la plaque en silicium. Le substrat et la résine sont ensuite placés sur des plaques chauffantes horizontales

dont la température est fixée à 65°C puis à 95°C afin de réduire les contraintes au sein de la couche de résine, cette étape s'appelle le pré-recuit. Procéder à un recuit de la résine avant et après l'exposition UV va permettre premièrement de solidifier la résine et deuxièmement d'évaporer le solvant résiduel présent dans cette résine afin de pouvoir la mettre en contact avec le masque lors de la prochaine étape, l'exposition au rayonnement UV. La durée des recuits est variable selon l'épaisseur de la résine (voir tableau 2.1).

3. L'exposition aux ultraviolets (UV) est l'étape qui va permettre de transférer les motifs du masque sur la résine. Ces motifs correspondent à la géométrie des microcanaux qui a été générée avec le logiciel L-Edit. Le masque est composé de deux zones, une zone opaque qui va bloquer les rayons UV, et une zone transparente qui va laisser passer ce rayonnement. Il doit être le plus près possible du substrat pour que la lumière parcourt le moins de trajet possible, pour une meilleure résolution. Le "côté motif" sera donc mis en contact avec le substrat (voir l'étape 3 de la figure 2.1).

Les masques utilisés pour réaliser des moules SU-8, correspondant au (a) module de la lyse tout seul, (b) module de tri tout seul et (c-d) module intégré (lyse + tri), sont présentés sur la figure 2.2.

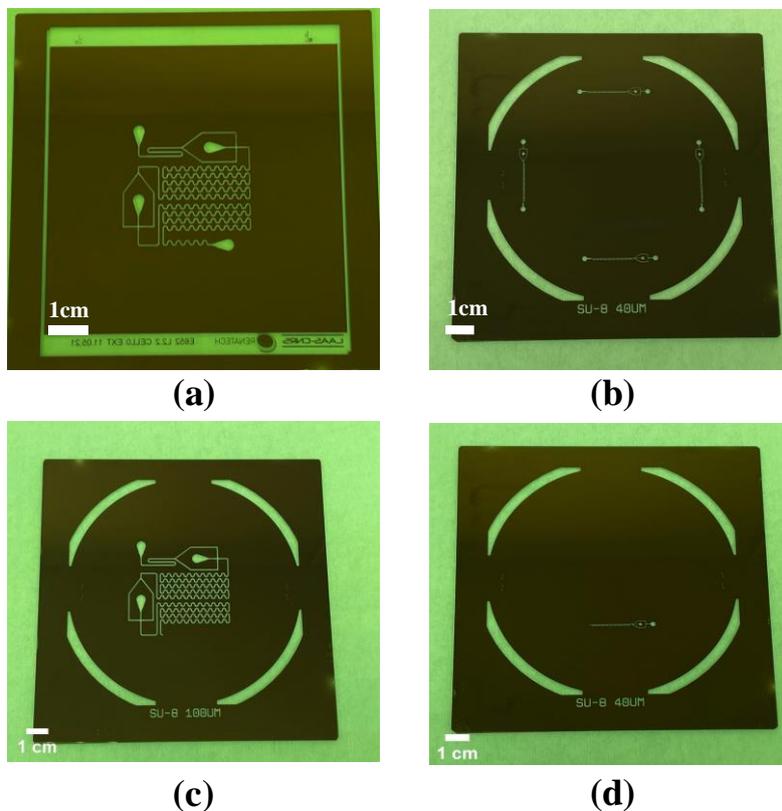


Figure 2. 2 Photographies (a) du masque de lyse du sang correspondant à la géométrie du design 7, du masque de tri cellulaire (b) et (c-d) les masques du module intégré. On peut observer que les parties transparentes des masques correspondent aux microcanaux microfluidiques.

L'exposition UV est réalisée au travers du masque comme indiqué dans la figure 2.1. Sous la zone transparente du masque (correspondant aux motifs des microcanaux), la résine se modifie chimiquement en présence des rayons UV, elle se réticule et reste sur le substrat en silicium, tandis que la résine qui est sous la zone opaque est non modifiée.

L'épaisseur de la résine dépend aussi du temps et de la dose d'insolation UV (voir tableau 2.1). Chaque épaisseur nécessite une certaine énergie (en mJ/cm^2). Cette énergie est égale à l'intensité de la lampe (en mW/cm^2) multipliée par le temps d'exposition (en secondes). L'énergie utilisée pour obtenir les épaisseurs de 20, 40 et 100 μm est respectivement d'environ 175, 230 et 315 mJ/cm^2 [102]–[104]. Les temps d'exposition doivent également être ajustés, car l'exposition joue un rôle très important non seulement dans la détermination de l'épaisseur de la résine mais aussi dans l'obtention d'une grande résolution des structures.

Au cours de cette thèse, deux équipements de photolithographie du C2N ont été utilisés. L'équipement d'alignement double face EVG 620 (puissance de la lampe = 7 mW/cm^2 , longueur d'onde = 365 nm) et l'aligneur de masque MJB4 (puissance de la lampe = 7 mW/cm^2 , longueur d'onde = 405 nm). Il faut mentionner que les paramètres de fabrication présentés dans le tableau 2.1 correspondent aux moules réalisés avec l'équipement d'aligneur de masque MJB4, là où j'ai fabriqué la plupart de mes substrats.

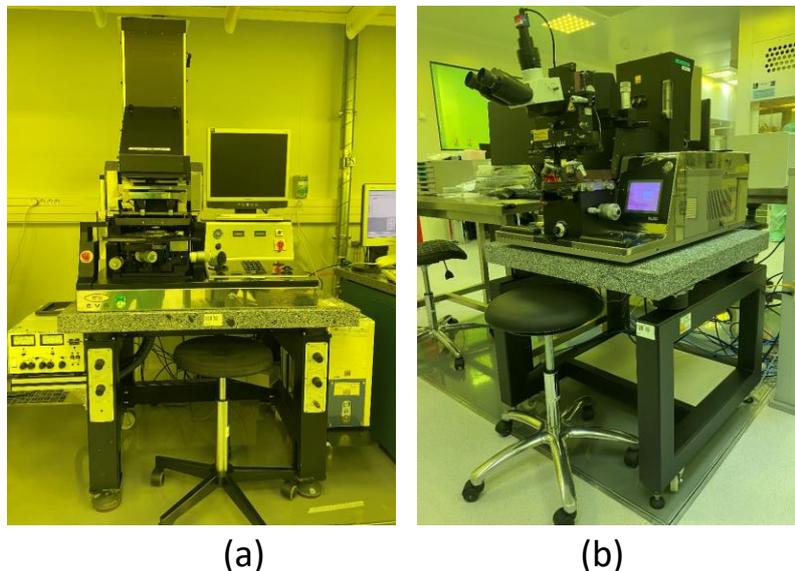


Figure 2. 3 Photographies des équipements de photolithographie utilisés au cours de cette thèse : (a) l'équipement de photolithographie EVG 620 et (b) l'équipement de photolithographie MJB4 du C2N.

Après l'exposition, et afin de rendre la résine plus adhérente au substrat, un autre recuit qu'on appelle post-recuit est appliqué sur le substrat à une température de 65°C puis de 95°C à des

temps qui dépendent de l'épaisseur (voir tableau 2.1). Cette étape de post-recuit est importante pour continuer la polymérisation et le durcissement de la résine.

- Le développement vient en dernier pour finir les étapes de réalisation d'un moule en photolithographie (voir l'étape 4 de la figure 2.1). Le moule est plongé dans un béccher qui contient un révélateur spécifique de la résine SU-8 sous agitation et pendant un temps déterminé dépendant de l'épaisseur de la résine qu'on souhaite (voir tableau 2.1). Cette étape permet de retirer la résine photosensible, qui a été non irradiée, et, de reproduire une image négative du modèle du masque sur le substrat. A noter qu'il faut choisir le temps de développement adapté en fonction de l'épaisseur de la résine, car un surdéveloppement provoque un gonflement des zones réticulées et un décollement des motifs. Enfin, le moule est rincé quelques minutes à l'isopropanol avant d'être séché sous flux d'azote gazeux.

N.B : Concernant le module intégré dédié à l'extraction des bactéries du sang, qui couple les deux modules de lyse et de tri, l'épaisseur de la résine à différents endroits du moule n'est pas la même. Elle est de 40 μm pour le module de tri et de 100 μm pour celui de la lyse. Pour cette raison, le protocole de fabrication est donc basé sur 2 niveaux successifs de lithographie UV dans la résine SU8, en commençant par le niveau de tri de 40 μm d'épaisseur qui est aligné avec le second niveau de lyse de 100 μm d'épaisseur. Les principales étapes de la fabrication de ce moule sont décrites dans la figure 2.4.

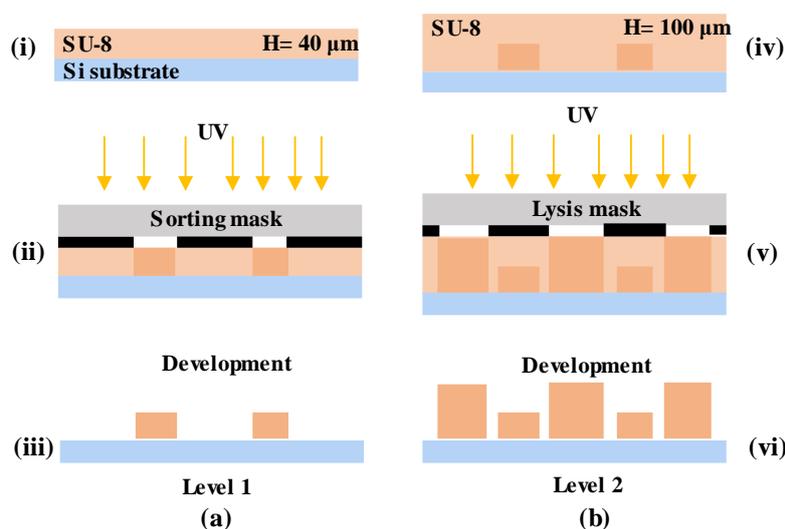


Figure 2. 4 Description du processus de fabrication du moule maître en Si basé sur deux étapes de lithographie UV dans une résine SU-8 pour obtenir deux hauteurs (h) différentes dans les deux modules fluidiques ($h=40\mu\text{m}$ pour le module de tri et $h=100\mu\text{m}$ pour le module de lyse).

Nous obtenons ainsi un moule avec des motifs en résine SU8 présentés sur les masques

optiques (voir figure 2.5).

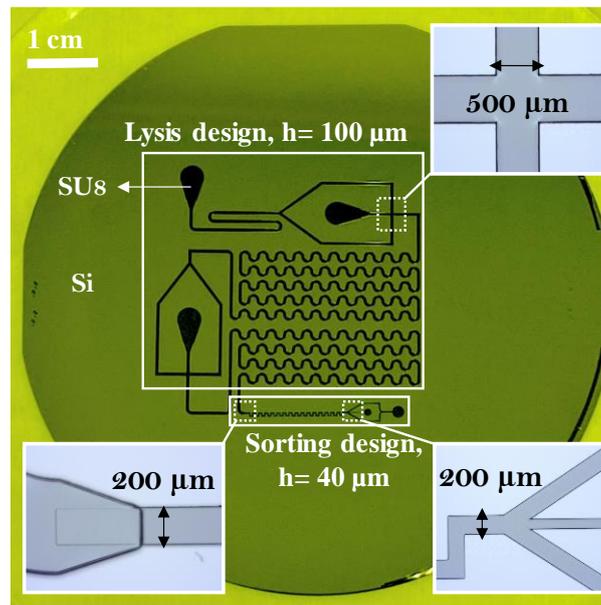


Figure 2. 5 Photographies du moule réalisé au microscope optique. On peut voir que les microcanaux sont bien définis et que la résine SU-8 entre les motifs est complètement éliminée. A noter que la hauteur des motifs ici n'est pas la même.

1.1.1 Caractérisation des moules fabriqués

Afin de vérifier la géométrie des motifs et de s'assurer de la bonne qualité de la photolithographie, les moules sont soumis à un examen par microscope optique pour contrôler la résolution des motifs et s'assurer que toute la résine non exposée a bien été éliminée. Cet examen peut donner aussi des informations sur la largeur des canaux. L'épaisseur des motifs est ensuite mesurée systématiquement à l'aide d'un profilomètre mécanique (Dektak 150). Une autre méthode de caractérisation, la microscopie électronique à balayage (MEB) peut nous donner également des informations sur les microcanaux fabriqués avec une précision plus grande sur la largeur et la hauteur des microcanaux. Le MEB permet également de vérifier la verticalité des murs et de visualiser la rugosité de surface. Pour notre application, la précision du MEB n'est pas indispensable, la plupart du temps nous utilisons uniquement le microscope optique et le profilomètre mécanique pour caractériser les moules. Vous trouverez ci-dessous des images obtenues par microscopie optique (figure 2.5), par microscopie électronique à balayage (figure 2.6), et par profilométrie mécanique (figure 2.7) à différents endroits du moule dédié pour le module intégré. Sur les deux figures 2.5 et 2.6, nous pouvons voir que les microcanaux sont bien définis et correspondent à la largeur attendue. Il n'y a aucune trace de résine non exposée entre les microcanaux. La figure 2.7 montre un exemple d'une analyse profilométrique mécanique de la hauteur des microcanaux d'un moule de lyse de sang tout seul, dont la hauteur attendue est de 100 µm. Des mesures en divers points du moule montrent

des variations de hauteur de motif de $\pm 1 \mu\text{m}$.

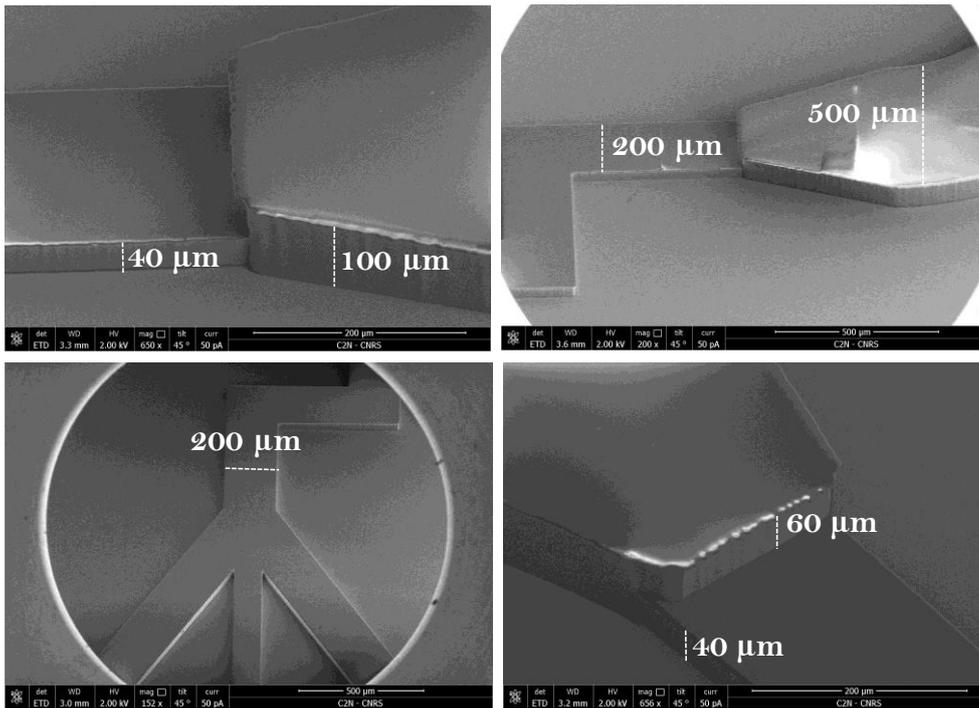


Figure 2. 6. Photographies du moule réalisé au microscope électronique à balayage.

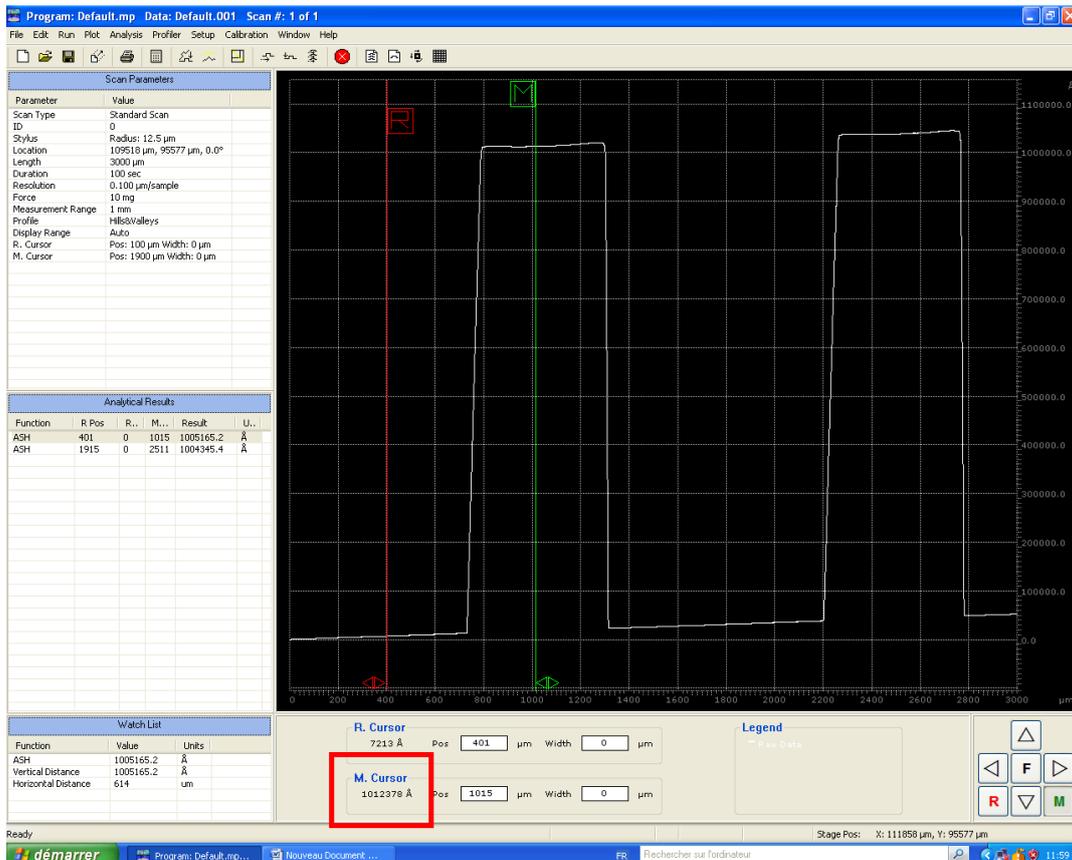


Figure 2. 7 Photographie d'une analyse par profilométrie mécanique d'un moule de lyse dont la hauteur des

motifs est de $100 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$. La partie encadrée en rouge montre la hauteur mesurée des motifs.

Hauteurs des microcanaux : $40 \mu\text{m}$; SU8 3050

Tournette			Temps de pré-recuit (min)		Temps d'insolation (s)	Temps de post-recuit (min)		Temps de développement (min)		
Accélération (tr/min/s)	Vitesse (tr/min)	Temps (s)	65°C	95°C	Puissance de la lampe : 7 mW/cm^2	65°C	95°C			
5	500	300	2	10		33	3		7	5 min
30	4000	300								

Hauteurs des microcanaux : $100 \mu\text{m}$; SU8 2050

Tournette			Temps de pré-recuit (min)		Temps d'insolation (s)	Temps de post-recuit (min)		Temps de développement (min)		
Accélération (tr/min/s)	Vitesse (tr/min)	Temps (s)	65°C	95°C	Puissance de la lampe : 7 mW/cm^2	65°C	95°C			
10	500	200	5	20		45	5		10	11 min
30	1650	300								

Hauteurs des microcanaux : $20 \mu\text{m}$; SU8 2010

Tournette			Temps de pré-recuit (min)		Temps d'insolation (s)	Temps de post-recuit (min)		Temps de développement (min)		
Accélération (tr/min/s)	Vitesse (tr/min)	Temps (s)	65°C	95°C	Puissance de la lampe : 7 mW/cm^2	65°C	95°C			
1000	1000	30	0	4		25	0		5	5 min

Tableau 2. 1 Paramètres utilisés en photolithographie pour obtenir les hauteurs de microcanaux suivantes : 20, 40 et $100 \mu\text{m}$.

1.2 Fabrication des dispositifs en PDMS

Le PDMS est un polymère siliconé très utilisé dans la construction de circuits microfluidiques car il est peu onéreux, présente de bonnes propriétés physico-chimiques (c'est un matériau hydrophobe par exemple) et surtout car il est bio-compatible. Sa formule brute est la suivante : $(\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi})_n$ et sa formule développée est $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, n étant le nombre de répétitions du monomère.

Historiquement, l'utilisation du PDMS, pour la fabrication de structures microfluidiques a été popularisée par le groupe de Georges Whitesides à Harvard [105], [106], [107].

Les blocs de PDMS sont préparés à partir d'un mélange d'une base pré-polymère et d'un agent réticulant. Cet agent réticulant permet de procurer au polymère de bonnes propriétés

mécaniques telles que l'élasticité, l'amortissement, la résistance au déchirement et permet également que le PDMS se réticule après l'échauffement. La base pré-polymère est constituée de chaîne de polyméthylsiloxane tandis que l'agent réticulant est une solution de copolymère de méthylhydrosiloxane et de diméthylsiloxane et d'un catalyseur organométallique [108]. Lorsque le mélange est soumis à la température de recuit, une réaction d'hydrosilylation permet de former le PDMS solide (figure 2.8). La proportion d'agent réticulant détermine les propriétés élastiques et mécaniques du PDMS. Plus il y a d'agent réticulant, moins le PDMS est élastique.

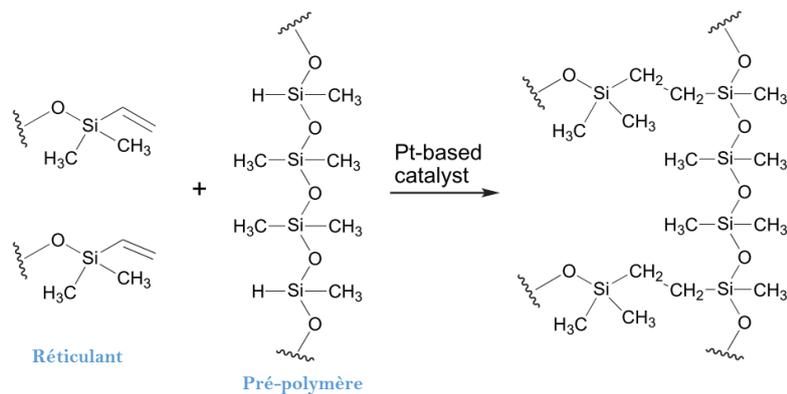


Figure 2. 8. Réaction de l'agent réticulant et du pré-polymère formant le PDMS [108].

Dans notre cas, nous avons prélevé 1 gramme de réticulant pour 10 grammes de pré-polymère afin d'obtenir le PDMS le plus flexible possible [109][110]. Après avoir placé le pré-polymère PDMS dans un bécher, on y dépose délicatement le réticulant. Le dépôt ne doit pas être trop rapide et doit bien être centré au milieu du bécher. Le mélange se fait en utilisant un mélangeur pendant 30 secondes pour obtenir un mélange homogène. La figure 2.9 schématise les étapes de fabrication des dispositifs en PDMS.

Tout d'abord, on met le moule réalisé en SU-8 dans une boîte de Pétri avant de verser le PDMS délicatement dans la boîte sur le moule réalisé précédemment. Cela aura notamment pour effet de créer de petites bulles d'air au sein du mélange. Pour les éliminer, le mélange est ensuite placé dans une cloche à vide (pendant 1h) jusqu'à disparition des bulles d'air infiltrées dans le PDMS. A noter que la quantité de PDMS liquide versé sur le moule est contrôlée afin d'obtenir une épaisseur de module d'environ 5 mm. Enfin, on dépose la boîte dans une étuve à 60 °C et on la laisse pendant quatre heures pour laisser le PDMS solidifier et devenir par la suite un polymère siliconé souple (voir l'étape 1 de la figure 2.9).

Une fois le PDMS réticulé, on décolle le capot en PDMS devenu solide à la base duquel le moule a laissé son empreinte. Cette pièce de PDMS peut alors être utilisée comme réseau de circulation pour les fluides. On découpe ensuite les parties inutiles de la pièce sur une lame de verre avec un scalpel pour que les dimensions de la puce soient minimales. Afin de permettre la connexion des canaux, le PDMS est percé à l'aide d'un emporte-pièce pour faire des trous au niveau des entrées et des sorties du circuit (voir l'étape 2 de la figure 2.9).

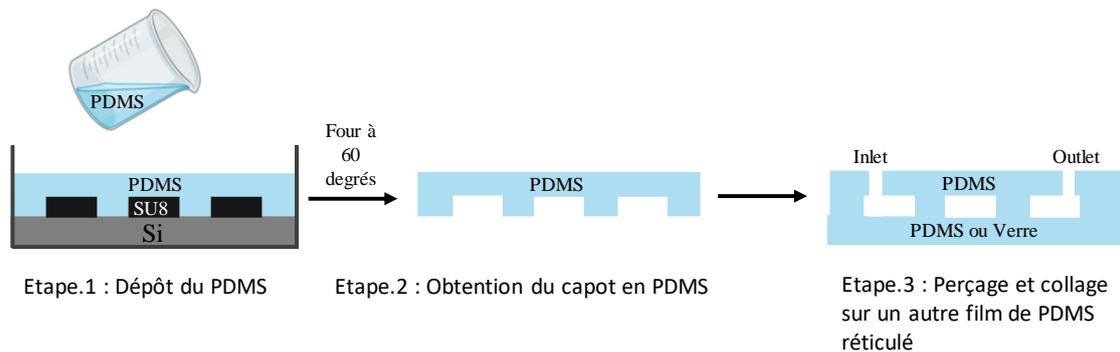


Figure 2. 9. Etapes de fabrication d'un module microstructuré de PDMS.

Au niveau de l'étanchéité des puces microfluidiques, nous avons utilisé deux protocoles de collage différents : 1) collage humide PDMS/hexane et/ou 2) collage PDMS/verre de type plasma oxygène (voir l'étape 3 de la figure 2.9). Les deux protocoles de collage sont décrits ci-dessous.

1.3 Collage des dispositifs

1.3.1 Collage humide PDMS/hexane

Pour ce type de collage, nous utilisons un protocole déjà breveté par notre équipe au C2N reposant sur un collage PDMS/PDMS en utilisant de l'hexane [111].

Ce protocole de collage est constitué de 3 étapes décrites dans la figure 2.10. Par ailleurs, je vous présente dans la figure 2.11 des photos prises en salle blanche pour une meilleure visualisation du protocole de fabrication.

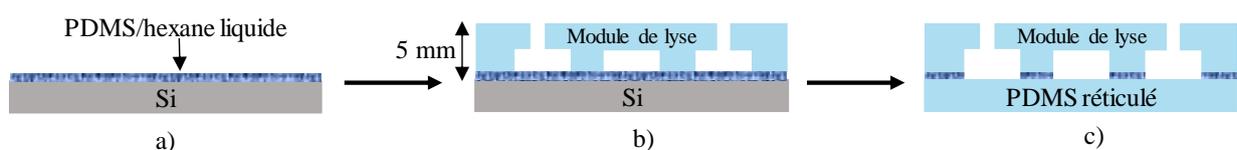


Figure 2. 10. Les différentes étapes du protocole de collage humide PDMS/hexane

La 1^{ère} étape consiste à mélanger 1,2 g de réticulant avec 12 g de pré-polymère (ratio 10 : 1 en

masse). Ensuite, on dilue ce mélange dans 48 g d'hexane (ratio 1 : 4 en masse). La solution finale est laissée 30 secondes dans un mélangeur pour obtenir un mélange homogène, puis elle est étalée sur une plaque de silicium par enduction centrifuge en utilisant les paramètres suivants : accélération : 300 tours/min/s, vitesse de rotation : 3000 tours/min et durée de rotation : 30 secondes. Ces paramètres nous permettent d'obtenir une couche mince d'environ 2 μm d'épaisseur.

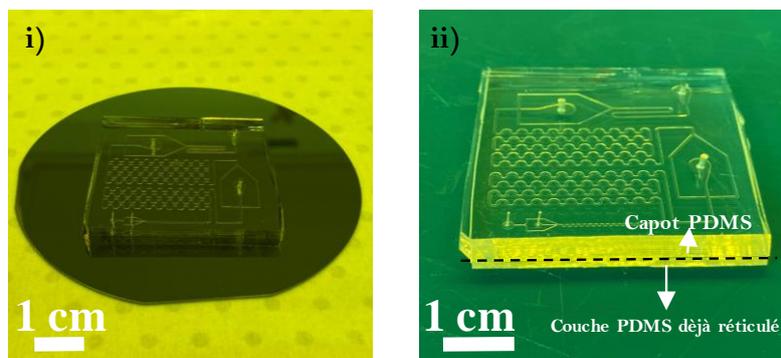


Figure 2. 11. A gauche (i), une photo du capot en PDMS « tamponné » sur la couche de PDMS/hexane. A droite (ii) une photographie du capot en PDMS mis en contact avec le film PDMS réticulé formant une structure bicouche. Les photographies sont prises sous hotte car l'hexane est un solvant toxique.

Pour la 2^{ème} étape, on tamponne le capot en PDMS sur la couche mince de PDMS/hexane liquide, et enfin, on le met en contact avec un film de PDMS déjà réticulé. Cet ensemble est mis en étuve à 60°C pendant 2 heures. Cela permet d'évaporer l'hexane et de réticuler la couche fine de PDMS entre le capot et le film. La figure 2.11 montre un capot en PDMS tamponné sur la couche de PDMS/hexane (figure 2.11 (i)) puis mis en contact avec le film PDMS (figure 2.11(ii)).

1.3.2 Collage de type plasma oxygène

Dans notre application, afin de coller le capot de PDMS sur du verre, on utilise également un collage de type plasma oxygène qui permet de coller ces deux surfaces de manière covalente (à l'échelle atomique).

Ce type de collage nécessite l'oxydation des surfaces qui vont être mises en contact (ici, PDMS et verre). Une oxydation du PDMS, à l'aide d'un plasma, modifie la chimie de surface du PDMS et produit des terminaisons silanol (SiOH) à sa surface (figure 2.12).

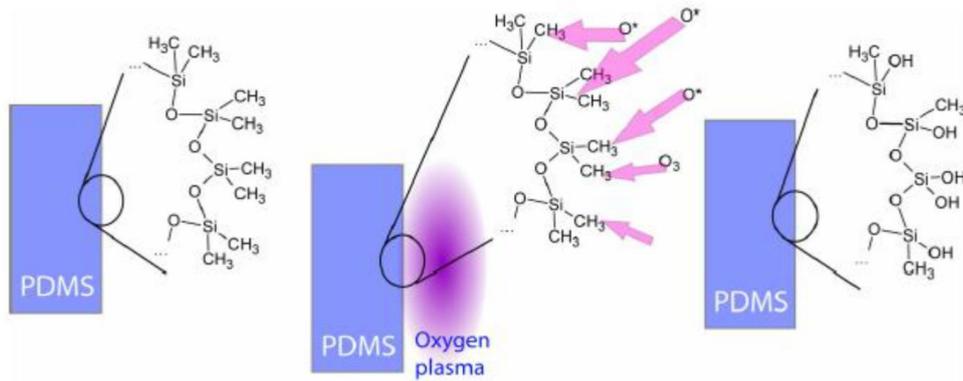


Figure 2. 12. Mécanisme d'oxydation du PDMS et formation de Silice SiOH [112]

Ceci permet de rendre le PDMS hydrophile pendant une trentaine de minutes. Ce procédé rend également la surface résistante à l'adsorption de molécules hydrophobes et chargées négativement. De même, l'oxydation plasma d'une surface de verre produit de liaison Si-O-Si. La procédure est la suivante :

Tout d'abord, on lave à l'éthanol le capot de PDMS et le substrat en verre du côté qui sera exposé au plasma oxygène. Ensuite, on place le capot et le substrat dans le plasma oxygène pendant 30 secondes (figure 2.13(i)). La face du capot qui viendra sur le substrat doit être évidemment orientée vers le haut dans la chambre où le plasma est généré. Enfin, l'assemblage des deux pièces se fait par contact le plus rapidement possible (dans les 15 secondes suivant la réalisation du plasma O₂).

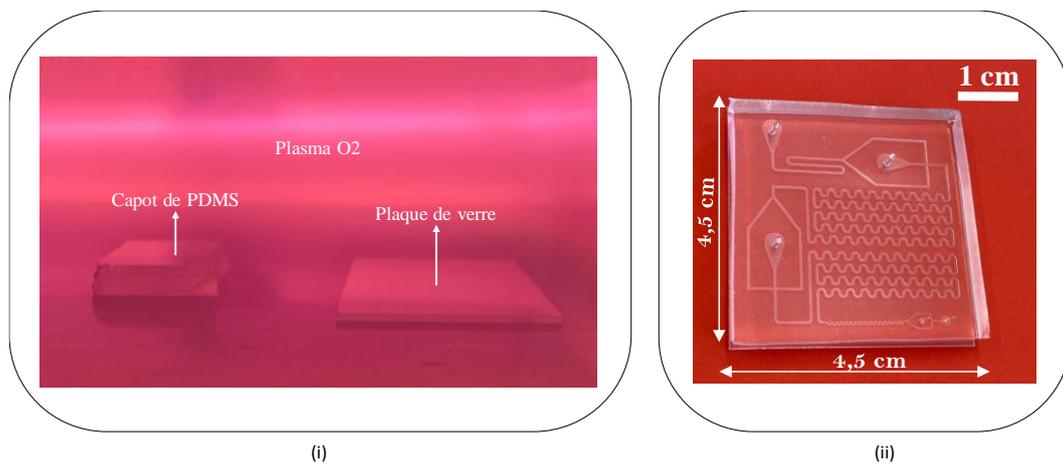


Figure 2. 13. (i) Photographie de la chambre Plasma O₂. (ii) Photographie de dispositif fluidique.

Pour que le collage soit bien finalisé, on laisse la puce pendant une heure dans une étuve à T=60 °C. Un exemple de dispositif ainsi obtenu est présenté en figure 2.13(ii).

2 Fabrication du module 2 : dédié à la détection électrochimique d'ADN

La détection d'ADN se fait dans des puces fabriquées au C2N. Ces puces sont constituées principalement d'une lame de verre intégrant des microélectrodes en Pt pour les mesures électrochimiques qui est fermée par un capot en PDMS contenant les canaux microfluidiques. Les principales étapes de la fabrication des puces Verre/PDMS sont :

- La lithographie des électrodes et des pistes électriques sur du verre.
- La métallisation de ces électrodes et le lift-off.
- La fabrication du moule SU8 puis le moulage du capot en PDMS contenant les canaux microfluidiques (dans lesquels circulent les solutions d'ADN).
- Le collage du PDMS/Verre.

2.1 Réalisation des électrodes par photolithographie

Les différentes étapes de photolithographie optique sur des plaques en verre, schématisées sur la figure 2.14, sont décrites en détail ci-dessous :

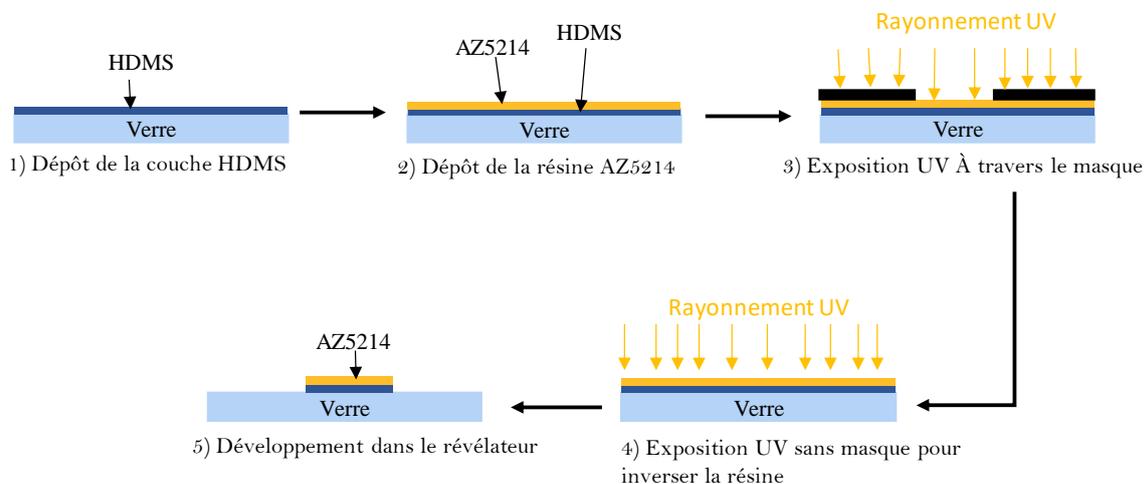


Figure 2. 14. Les différentes étapes de photolithographie optique avec une résine mince (AZ5214)

La première étape consiste à déposer un film d'hexaméthylsilazane (HDMS) comme une couche d'accroche. Cette couche de HDMS est donc étalée sur le substrat à l'aide d'une tournette « spin-coater » suivant un programme bien déterminé (vitesse = 4000 tours/min ; $a = 2000$ tours/min/s et $t = 30$ s) (voir l'étape 1 de la figure 2.14).

La deuxième étape est le dépôt d'un film résine photosensible AZ5214 sur le substrat en verre

par enduction rotative avec le même programme spin-coater utilisé pour déposer la première couche HDMS (voir l'étape 2 de la figure 2.14). La résine AZ5214 est une résine photosensible réversible dont on peut changer la polarité après un recuit ou une deuxième exposition UV. Pour notre application, nous utilisons cette résine réversible qui permet de réaliser des motifs d'une épaisseur égale à 1,4 μm . Le substrat en verre est ensuite chauffé sur une plaque chauffante horizontale à 110°C pendant 1 min afin de faire évaporer les solvants présents dans la résine pour augmenter l'adhésion de la résine et pouvoir la mettre en contact avec le masque lors de la prochaine étape : exposition aux UV.

La troisième étape consiste à illuminer le substrat en verre recouvert en résine par une source UV au travers du masque (en mode Hard contact) pendant 5 secondes à l'aide d'un aligneur UV « MJB4 » (voir l'étape 3 de la figure 2.14). Cet aligneur envoie un rayonnement UV avec une gamme de longueurs d'onde bien définie ($\lambda = 365\text{-}405\text{ nm}$, puissance de la lampe = 7 mW/cm²) grâce au filtre placé entre la lampe de Mercure et l'échantillon à insoler. Cette étape nous permet de reproduire la structure des motifs existant sur le masque optique (figure 2.15) dans la résine. Ces motifs correspondent à la géométrie des électrodes qui a été générée avec le logiciel L-edit.

L'étape d'insolation est toujours suivie d'un recuit de 2 min à une $T = 120\text{ }^\circ\text{C}$. La couche de résine subit alors une deuxième étape de lithographie UV sans le masque (voir l'étape 4 de la figure 2.14) pendant 35 secondes, ce qui permet d'inverser la résine. Ceci signifie que les motifs obtenus au cours de la 1^{ère} insolation deviennent insolubles dans le développeur. Cette étape est appelée « floodexposure ». Les motifs de résine obtenus correspondent donc aux zones chromées du masque.

La dernière étape est le développement (voir l'étape 5 de la figure 2.14). Le substrat est plongé dans un bain qui contient le développeur MIF AZ826 pendant 50 secondes. Ce liquide va dissoudre sélectivement la résine dans les zones non insolées. Le substrat est ensuite rincé dans l'eau déionisée pendant 2 min. Enfin, l'échantillon subit une attaque par plasma O₂ pendant 30 secondes afin de retirer d'éventuelles traces de résine au fond des motifs.

Le masque correspondant au module de détection électrochimique contenant les motifs d'électrodes électriques est présenté sur la figure 2.15.

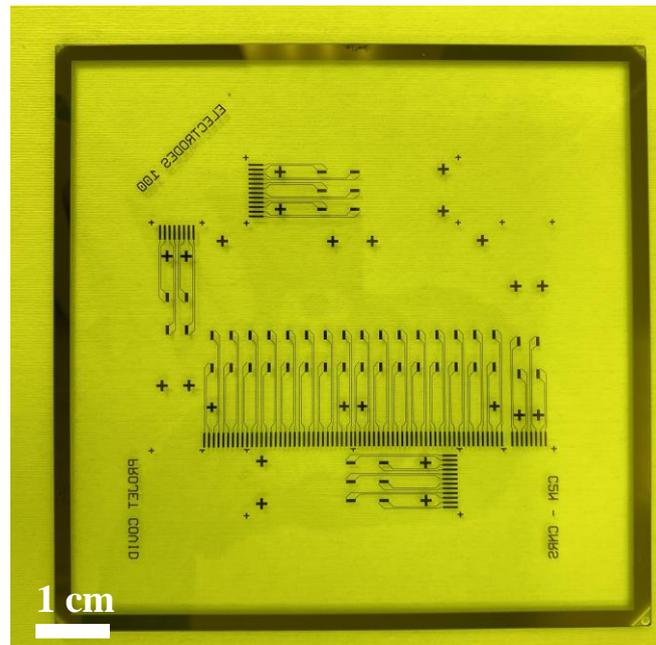


Figure 2. 15. Photographie du masque utilisé pour fabriquer les électrodes intégrés dans le module de la détection électrochimique.

2.2 Métallisation et lift-off des électrodes

Pour la métallisation du moule, il faut choisir des matériaux présentant a priori les qualités requises pour réaliser les électrodes. Dans notre application, nous avons choisi le platine. Le platine est un métal noble qui n'est pas oxydable dans l'eau (quel que soit le pH) et qui présente une conductivité électronique élevée.

Afin d'améliorer l'adhésion du platine sur le substrat en verre, nous avons utilisé une couche d'accroche en titane. Nous avons donc déposé sur le substrat en verre microstructuré en résine AZ5214 une bicouche de Ti/Pt d'épaisseur 5 nm/50 nm en utilisant la technique d'évaporation. Les molécules de métal se condensent sur le substrat pour former une couche mince d'épaisseur prédéfinie (voir l'étape 1 de la figure 2.16).

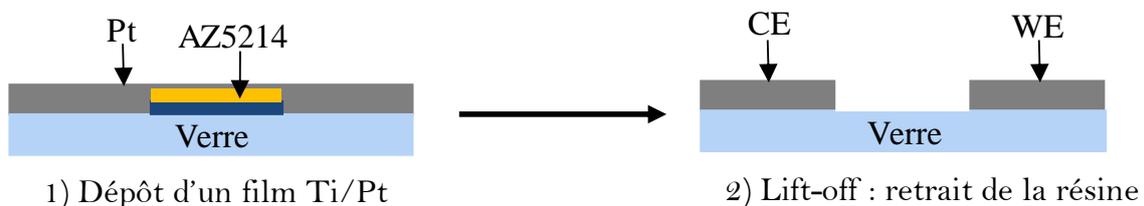


Figure 2. 16. Dépôt métallique et lift-off

Cette étape est toujours suivie par un lift-off de la résine. Cette opération consiste à mettre

l'échantillon dans un bain d'acétone pendant 5 min pour enlever la résine et garder uniquement le métal collé au substrat (voir l'étape 2 de la figure 2.16). La figure 2.17 montre la photo du substrat en verre intégrant les électrodes de platine après le lift-off. Le wafer de verre est découpé à la fin à l'aide d'une scie diamantée (disco DAD641 automatic dicing saw) permettant d'obtenir six dispositifs indépendants.

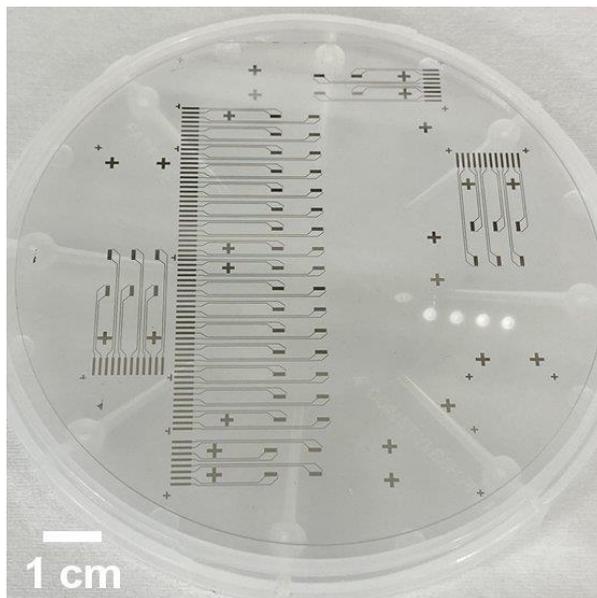


Figure 2. 17. Wafer en verre intégrant les électrodes en platine

Concernant la fabrication du moule SU8 contenant les canaux microfluidiques dans lesquels circulent les solutions d'ADN, nous suivons les mêmes étapes de la lithographie UV mentionnées dans le paragraphe I.1. Le masque utilisé pour fabriquer ces canaux est représenté dans la figure 2.18.

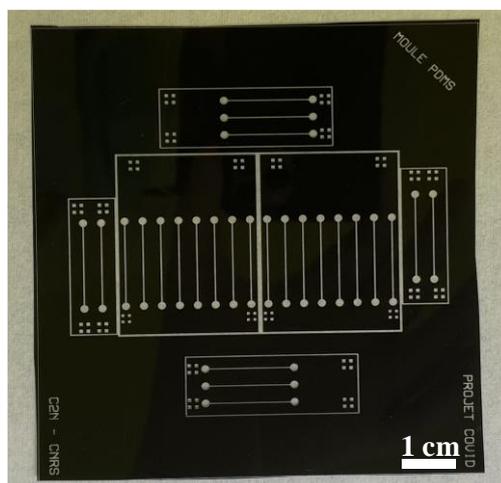


Figure 2. 18 Masque en plastique utilisé pour fabriquer les canaux microfluidique du module de détection

Quant à la fabrication du capot PDMS, nous suivons le même protocole mentionné dans le paragraphe 1.2.

L'étape finale est le collage du capot PDMS sur la plaque de verre intégrant les microélectrodes en platine. Pour effectuer ce collage, nous suivons le protocole de collage PDMS/VERRE mentionné dans le paragraphe 1.3.2. Il est important que les microcanaux se collent de manière reproductible avec un bon alignement par rapport aux électrodes.

3 Mise en place des connectiques fluidiques

Afin de faire circuler les fluides à partir des trous précédemment percés comme des entrées et des sorties, nous avons utilisé des tuyaux en silicone lisse et biocompatible dédiés à des applications biochimiques (Platinum-cured silicone tubing, Darwin Microfluidics).

Pour connecter ces tuyaux à nos puces microfluidiques PDMS, nous avons utilisé des connecteurs en acier inoxydable (Stainless steel straight PDMS couplers, Darwin Microfluidics), parfaits pour une utilisation avec des tubes microfluidiques en silicone. La figure 2.19 présente des dispositifs microfluidiques complets et prêts à être utilisés.

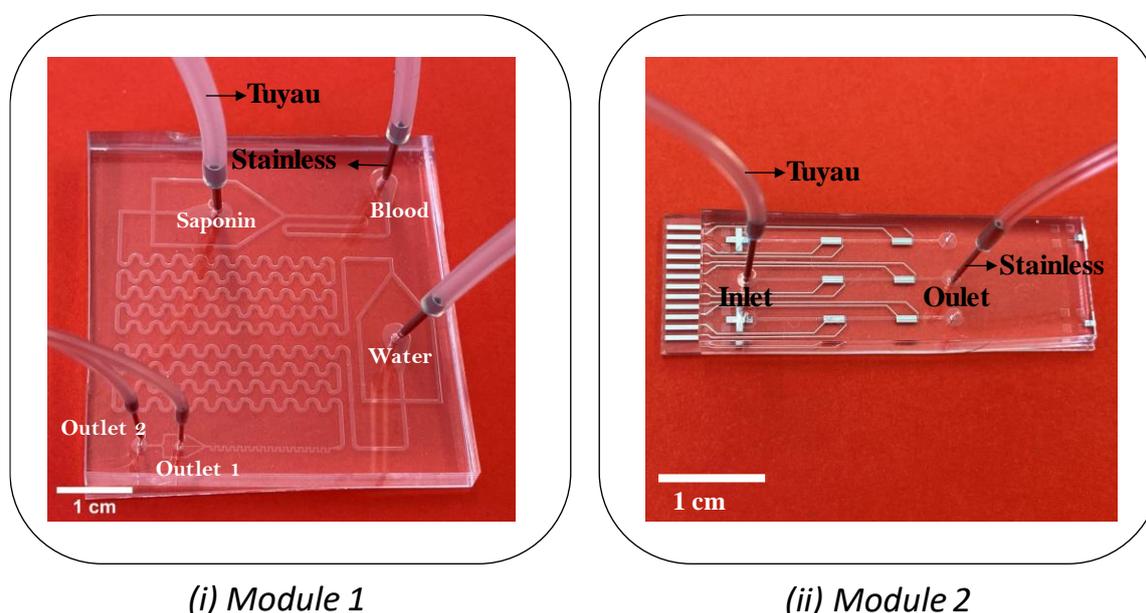


Figure 2. 19. Dispositifs complets avec les connectiques fluidiques à l'entrée et aux sorties des fluides. i) Module 1 : dédié à l'extraction des bactéries du sang permettant les deux étapes de lyse du sang puis de tri par microfluidique inertielle. ii) Module 2 : dédié à la détection électrochimique.

Chapitre 3 – Performance du module de lyse : méthodes et mesures

Ce chapitre rapporte toutes les expériences qui ont été menées pour mettre au point le protocole de lyse du sang. L'enjeu ici est bien de détruire l'ensemble des cellules sanguines sans endommager les bactéries présentes dans le sang.

La première partie de ce chapitre décrit les expériences de lyse à l'échelle macroscopique. Nous y rapportons un ensemble d'expériences réalisées avec différentes concentrations en saponine et différents ratio saponine/eau, dont le but était de trouver les conditions optimales. Il suit une section où nous analysons des solutions bactériennes mises en contact avec, soit la saponine, soit de l'eau, pour étudier si leur viabilité est affectée.

La deuxième partie du chapitre décrit comment le protocole optimal de lyse à l'échelle macroscopique a pu être transféré dans la puce microfluidique (module de lyse). Cette partie décrit d'abord l'optimisation de la géométrie du module de lyse et l'optimisation du débit des fluides de façon à maximiser le mélange de solutions aqueuses contenant des colorants. Enfin, la 7^{ème} géométrie proposée, optimale pour le mélange des solutions aqueuses colorées, est étudiée en comparant des simulations COMSOL avec nos résultats expérimentaux. Le chapitre s'achève avec les expériences de lyse de sang de cheval défibriné, qui conduisent au protocole de lyse sur puce optimisé.

1 Détermination du pouvoir lytique de la saponine et/ou de l'eau à l'échelle macroscopique sur les cellules sanguines par cytométrie en flux

1.1 Principe de la cytométrie en flux

Le suivi de la lyse des cellules sanguines s'effectue à l'aide d'un cytomètre en flux. Cette technologie est détaillée brièvement dans cette partie pour une meilleure compréhension de la méthode. Il s'agit d'une technique permettant le comptage et l'identification de cellules. Chaque cellule présente dans une solution donnée (cellules isolées et mises en suspension) est analysée indépendamment. Cette technique permet d'analyser un grand nombre de cellules en un temps relativement court, ce qui lui confère une robustesse statistique intéressante [113].

La cytométrie en flux permet d'étudier deux paramètres :

- les paramètres morphologiques, taille et granularité
- les paramètres de fluorescence, liés à l'utilisation de fluorophores.

La Figure 3.1 représente le principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux.

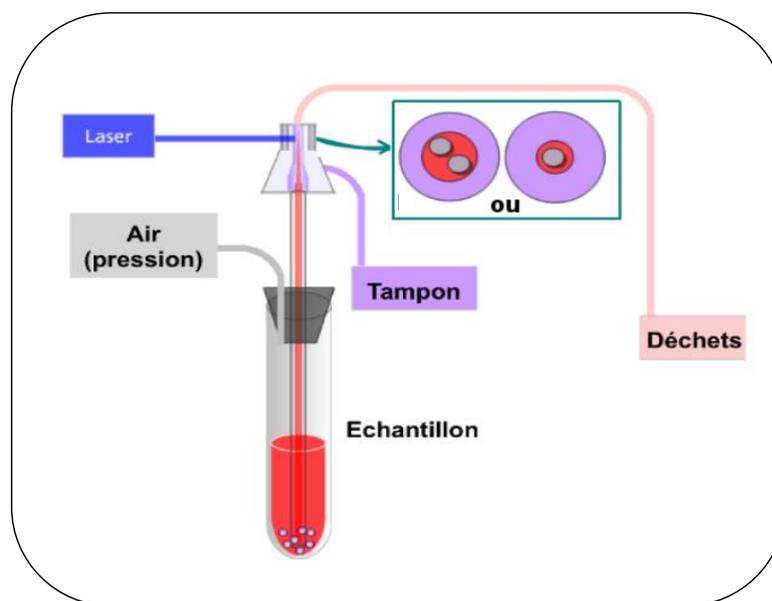


Figure 3. 1 La circulation des fluides dans l'appareil et le trajet de la lumière [113].

L'échantillon contenant la suspension cellulaire à analyser est fixé hermétiquement à une tige creuse sur l'appareil. De l'air est pompé dans le tube, forçant l'échantillon à remonter dans la tige. La colonne d'échantillon est ensuite entourée par une colonne de liquide tampon. Ainsi, l'échantillon entre dans la chambre de lecture, où il est excité par un faisceau laser. Le gainage

par le tampon permet de forcer les cellules à passer une par une dans la chambre de lecture [113].

La diffusion frontale du faisceau incident (Forward scatter, FSC) indique la taille des cellules, tandis que la diffusion latérale (Side scatter, SSC) indique leur granularité (figure 3.2).

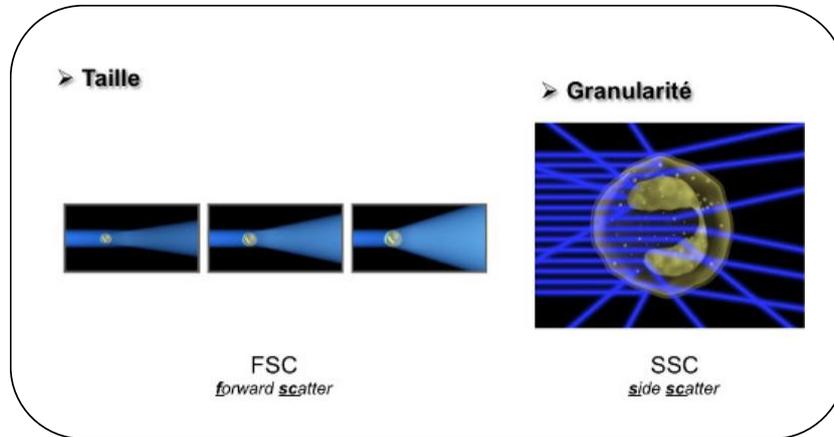


Figure 3. 2 Analyse des paramètres morphologiques : taille et granularité [113]

La mesure simultanée de ces deux paramètres permet d’obtenir une matrice représentant la complexité interne des cellules ou leur granulosité en fonction de leur taille. On appelle matrice une représentation bi-paramétrique des cellules (figure 3.3).

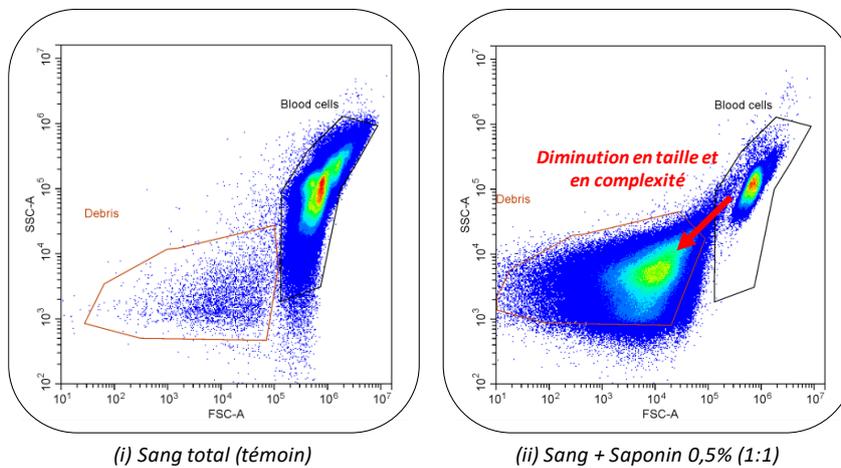


Figure 3. 3 Matrices représentant la complexité interne de la cellule en fonction de leur taille cellulaire. (i) Solution sanguine témoin. (ii) Solution sanguine additionnée de saponine à 0,5%.

A titre d’exemple, la figure 3.3 présente les matrices obtenues pour deux échantillons sanguins : un échantillon de sang total (solution témoin, figure 3.3(i)) et un échantillon de sang additionné de la saponine à 0,5% m/v (figure 3.3(ii)). Nous considérons que la lyse des cellules sanguines est effective lorsque leur taille et leur complexité cellulaire diminuent. Le suivi de

la lyse s'effectue selon deux régions. Les régions ont été obtenues grâce au témoin négatif (échantillon de sang dilué x20 dans un tampon NaCl 0,9% m/V, figure de gauche). Dans chaque matrice, la première région à droite est la région « Blood cells », définie en l'absence des réactifs de la lyse. Cette région définit l'ensemble des cellules sanguines non lysées. La deuxième région a été définie en considérant le bruit qui existe à gauche de la région « Blood cells » qui correspond aux quelques débris existant déjà dans le sang total avant la lyse.

Lorsque les réactifs de la lyse sont ajoutés, les objets se déplacent vers la gauche et passent la région « Blood Cells » à la région « Debris », traduisant une diminution de la taille et de la complexité des objets étudiés (figure 3.3(ii)). Chaque point représenté en bleu est un objet, c'est-à-dire une cellule sanguine si elle est présente dans la région « Blood cells », et un débris s'il apparaît dans la région « Debris ». La différence de couleur provient de la superposition de plusieurs objets ayant la même taille et la même complexité. Ainsi, la petite région en rouge de la région « Blood cells » correspond à un grand nombre de cellules sanguines ayant toutes la même taille et la même complexité.

1.2 Protocole d'incubation et analyse par cytométrie

La lyse sélective des cellules sanguines à l'échelle macro a été réalisée comme indiqué dans la figure 3.4.

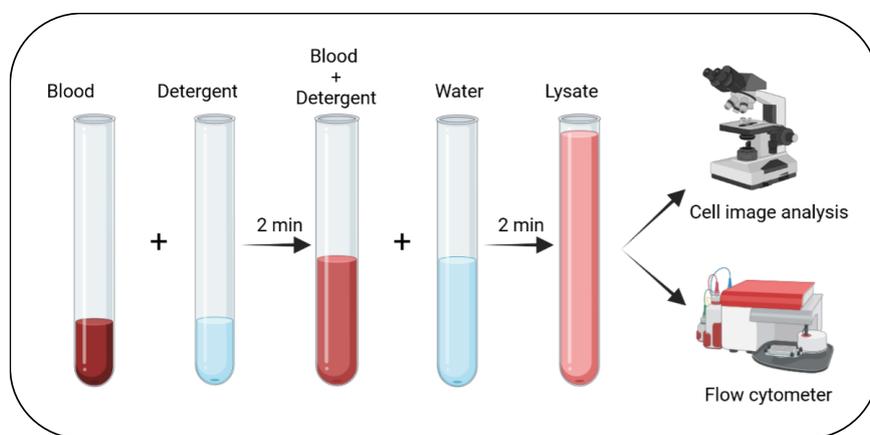


Figure 3. 4 Protocoles de la lyse à l'échelle macroscopique

La 1^{ère} étape consiste à ajouter au sang de la saponine. La saponine est un tensioactif très connu pour sa cytotoxicité et ses caractéristiques membranolytique et hémolytique [2], [32], [78], [114]. La 2^{ème} étape consiste à ajouter de l'eau afin de lyser les cellules sanguines restées intactes après l'ajout de saponine. Cette étape détruit les cellules par voie osmotique (voir chapitre 1, page) [2], [115]. Pour chaque étape, le temps d'incubation a été fixé à 2 min à température ambiante.

Nous avons optimisé ces deux étapes simultanément jusqu'à l'obtention d'une lyse cellulaire complète. Pour étudier l'influence de la saponine et/ou de l'eau déionisée sur les cellules sanguines, nous avons préparé différentes solutions. D'une part, nous avons étudié l'influence de l'osmolarité du milieu après l'ajout de l'eau déionisée au sang [115], [116]. D'autre part, nous avons examiné l'association de la saponine (0,5 et 1 % m/v) à l'eau (ainsi au choc osmotique)[2], [32], [78], [114]. Ces analyses ont été comparées à des échantillons témoins constitués de sang dilué avec du NaCl (0,9 % m/v).

Les solutions ont été préparées suivant les protocoles ci-dessous :

1. Prendre 7 Eppendorfs stériles numérotés de 1 à 7 :
 - i. Dans l'**Eppendorf N°1** témoin (= Echantillon sanguin + NaCl 0,9% (1:1)), nous avons mélangé :
 - 1 mL de l'échantillon sanguin
 - 1 mL de NaCl 0,9%
 - ii. Dans l'**Eppendorf N°2** (= Echantillon sanguin + Eau déionisée (1:1)), nous avons mélangé :
 - 1 mL de l'échantillon sanguin
 - 1 mL d'eau déionisée
 - iii. Dans l'**Eppendorf N°3** (= Echantillon sanguin + Saponine 0.5% m/v (1:1)), nous avons mélangé :
 - 1 mL de l'échantillon sanguin
 - 1 mL de saponine à 0,5%
 - iv. Dans l'**Eppendorf N°4** (= Echantillon sanguin + Saponine 1% m/v (1:1)), nous avons mélangé :
 - 1 mL de l'échantillon sanguin
 - 1 mL de saponine à 1%
 - v. Dans l'**Eppendorf N°5** (= Echantillon sanguin + Saponine 0.5% m/v + Eau déionisée (1:1:1)), nous avons mélangé :
 - 1 mL de l'échantillon sanguin

- 1 mL de saponine à 0,5%
 - 1 mL d'eau déionisée
- vi. Dans l'**Eppendorf N°6** (= Echantillon sanguin + Saponine 1% + Eau déionisée (1:1:1)), nous avons mélangé :
- 1 mL de l'échantillon sanguin
 - 1 mL de saponine à 1%
 - 1 mL d'eau déionisée
- vii. Dans l'**Eppendorf N°7** (= Echantillon sanguin + Saponine 1% + Eau déionisée (1:1:2)), nous avons mélangé :
- 1 mL de l'échantillon sanguin
 - 1 mL de saponine à 1%
 - 2 mL d'eau déionisée
2. Incuber les tubes pendant 4 min à température ambiante (temps de traitement)
3. Analyser les solutions à l'aide d'un cytomètre en flux.

1.2.1 Résultats et discussion

1.2.1.1 Effet de l'osmolarité du milieu sur le sang

La figure 3.5 présente les matrices obtenues pour deux échantillons sanguins : un échantillon de sang total avant la lyse (i) et un échantillon de sang additionné d'eau déionisée (ii).

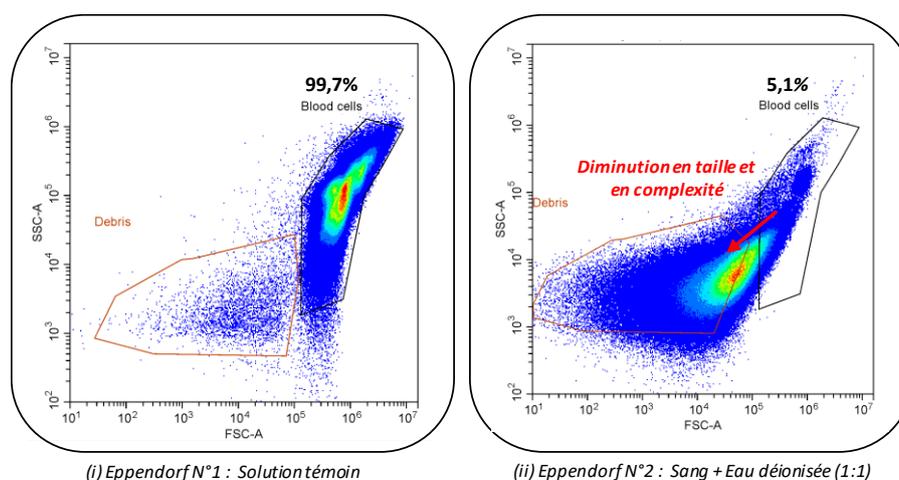


Figure 3.5 Matrices obtenues pour deux échantillons sanguins : un échantillon de sang total avant la lyse (i) et un échantillon de sang additionné de l'eau déionisée (ii).

Dans la figure 3.5(ii), nous remarquons que le nuage illustrant les cellules sanguines dans la région « Blood cells » est moins intense par rapport à celui de la solution témoin (figure 3.5(i)). Cela indique qu'une partie des cellules ont été lysées. Nous remarquons également le déplacement du nuage vers la région « Débris », caractéristique des objets dont la taille et la complexité ont diminué.

Le traitement des données par le logiciel Cytoexpert montre qu'il reste 5,1 % des cellules sanguines dans la région Blood cells. Cela signifie que ce protocole de lyse ne permet pas de lyser la totalité des cellules sanguines.

Ceci est en cohérence avec les travaux de Zelenin *et al.* [2] mentionnant qu'un choc osmotique tout seul n'est pas suffisant pour lyser la totalité des cellules sanguines.

1.2.1.2 Effet de la saponine sur les cellules sanguines

La figure 3.6 présente les matrices obtenues pour un échantillon de sang additionné de saponine à (i) 0,5% (Eppendorf N°3) et à (ii) 1 % (Eppendorf N°4).

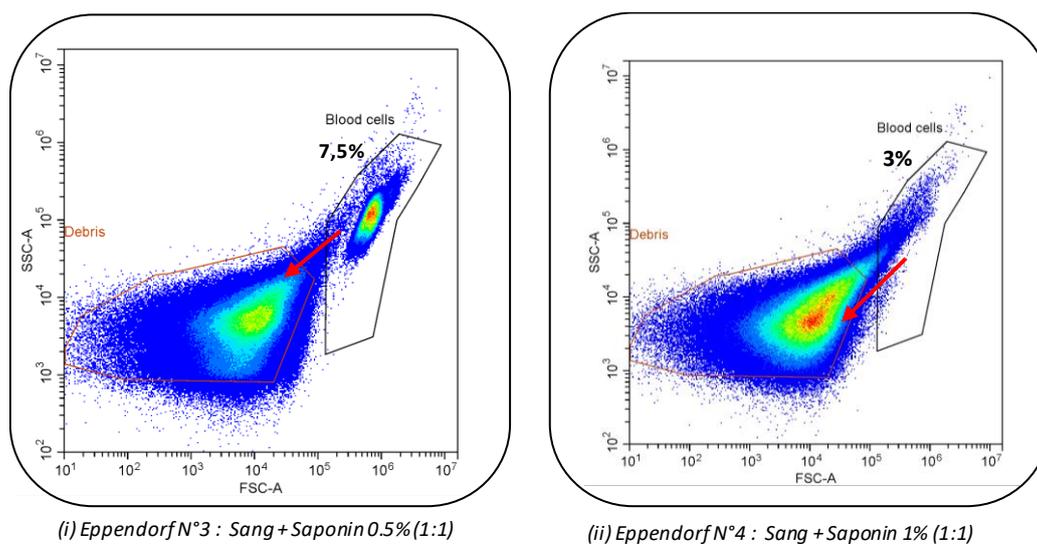


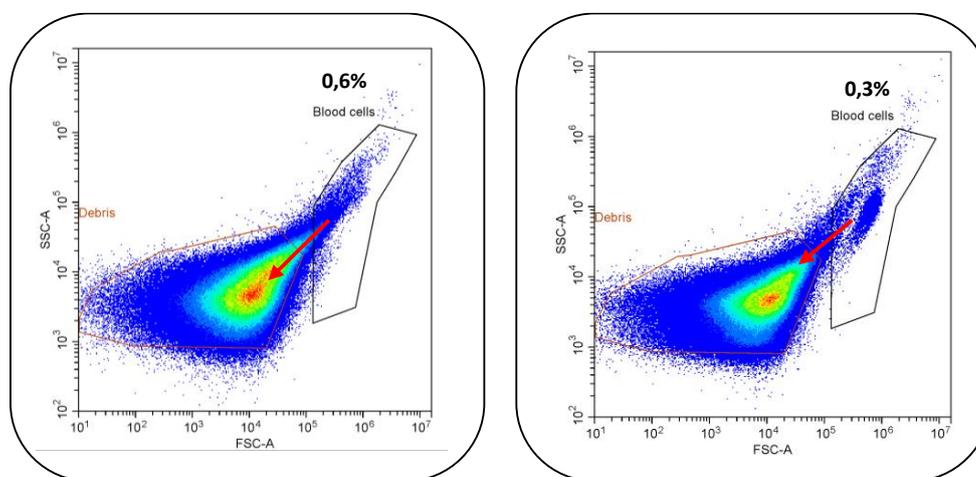
Figure 3. 6 Matrices obtenues pour deux échantillons sanguins : un échantillon de sang additionné de saponine à 0.5% (i) et un échantillon de sang additionné de saponine à 1% (ii).

Dans la figure 3.6(i) et 3.6(ii), nous remarquons, comme pour l'expérience précédente (ajout uniquement d'eau), que le nuage illustrant les cellules sanguines dans la région « Blood cells » diminue et se déplace vers la région « Débris ». Nous remarquons également que le pourcentage des cellules sanguines dans la région Blood cells diminue jusqu'à 7,5% lorsqu'on ajoute de la saponine à 0,5%, et jusqu'à 3% lorsqu'on ajoute de la saponine à 1%. **Ceci est en cohérence avec les travaux de Zelenin *et al.* [2] mentionnant que l'ajout de la saponine**

toute seule n'est pas suffisant pour lyser la totalité des cellules sanguines et que l'ajout d'eau après l'exposition des cellules sanguines à la saponine augmente le potentiel de la lyse. En s'appuyant sur ces travaux, nous avons effectué une étude avec une concentration en saponine variant de 0,5% et 1% en ajoutant de l'eau pour induire en plus un choc osmotique.

1.2.1.3 Effet de la saponine associé à un choc osmotique sur le sang

La figure 3.7 présente les matrices obtenues pour un échantillon de sang additionné de saponine à 0,5% ((i) Eppendorf N°5) et à 1% ((ii) Eppendorf N°6) et associé à un choc osmotique en ajoutant de l'eau (Sang : Saponine : Eau 1 : 1 : 1).



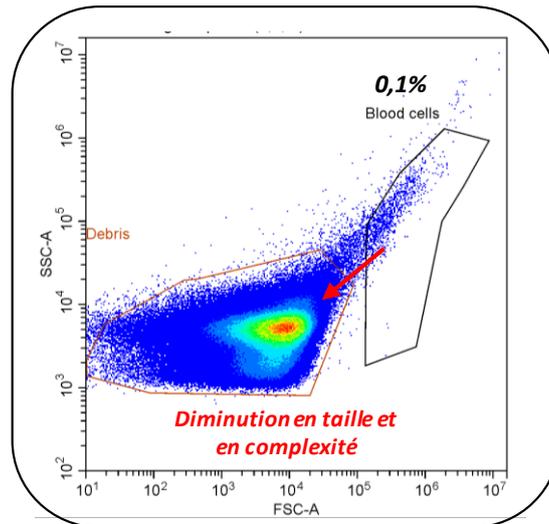
(i) Eppendorf N°5 : Sang + Saponin 0,5% + Eau déionisée (1:1:1) (ii) Eppendorf N°6 : Sang + Saponin 1% + Eau déionisée (1:1:1)

Figure 3. 7 Matrices obtenues pour deux échantillons sanguins : Eppendorf N°5 (i) et Eppendorf N°6 (ii).

Les résultats montrent, qu'après l'ajout de la saponine, le nuage illustrant les cellules sanguines dans la région « Blood cells » diminue beaucoup plus qu'avec un simple ajout d'eau.

Nous remarquons également que le pourcentage des cellules sanguines dans la région « Blood cells » diminue jusqu'à 0,6% lorsqu'on ajoute de la saponine à 0,5%, et jusqu'à 0,3% lorsqu'on ajoute de la saponine à 1%. **Ceci confirme que la saponine a un pouvoir lytique très important sur les cellules sanguines [78] et que l'utilisation du détergent avant le choc osmotique élimine la quasi-totalité des cellules sanguines [2].**

Nous avons regardé s'il était possible d'augmenter l'efficacité de la lyse en doublant le volume d'eau, c'est à dire d'utiliser un rapport (1 : 1 : 2). La figure 3.8 présente la matrice obtenue pour un échantillon de sang additionné de saponine à 1% (Eppendorf N°7) et associé à un choc osmotique (Sang : Saponine : Eau 1 : 1 : 2).



Eppendorf N°7 : Sang + Saponin 1% + Eau déionisée (1:1:2)

Figure 3. 8 matrice obtenue pour un échantillon de sang additionné de saponine à 1 % (Eppendorf N°7) et associé à un choc osmotique.

Les résultats obtenus montrent qu'il reste 0,1 % des cellules sanguines dans la région « Blood cells ».

La figure 3.9(i) représente le pourcentage de cellules sanguines survivantes en appliquant les 7 protocoles de lyse testés. Nous remarquons que le meilleur protocole pour produire une lyse cellulaire efficace est celui qui a été appliqué dans l'Eppendorf 7 puisqu'il contient le pourcentage le plus faible de cellules intactes (0.1%).

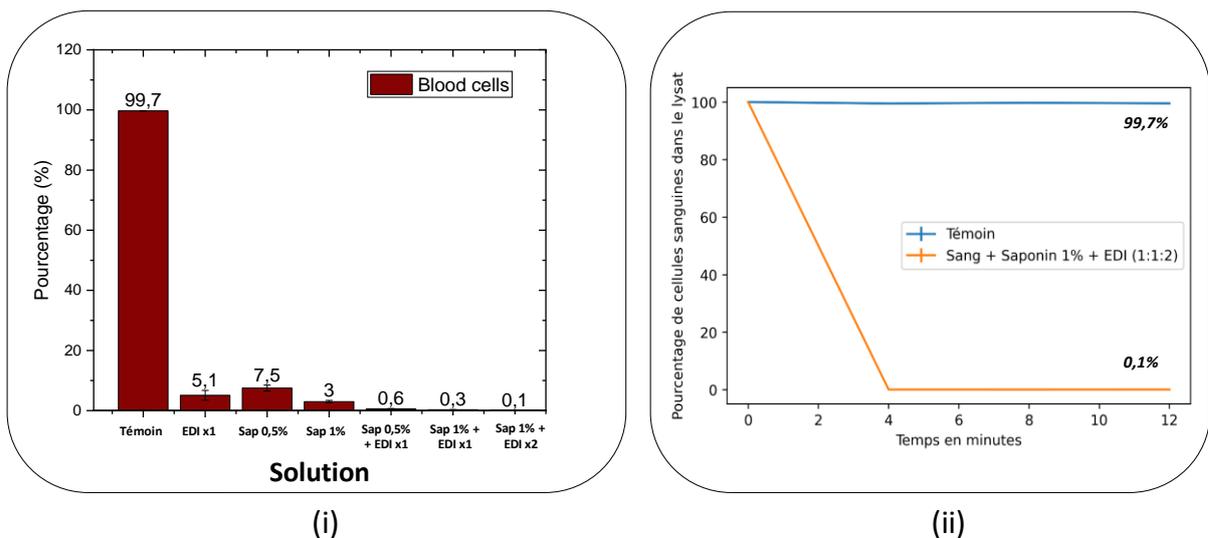


Figure 3. 9 Pourcentage des cellules sanguines dans le lysat pour chaque Eppendorf (i). Courbe de la lyse cellulaire pour le protocole optimal (ii).

La figure 3.9(ii) illustre le pourcentage de cellules sanguines dans les Eppendorf N°1 et N°7 en fonction du temps. La courbe bleue représente la solution témoin. À $t=0s$, le pourcentage de cellules sanguines dans cette solution est 99,7%, cette valeur reste constante au cours du temps. La courbe orange représente la solution lysée dans l'Eppendorf N°7. Le pourcentage de cellules sanguines diminue de 99,7% à 0,1% en 4 min ce qui confirme l'efficacité du protocole de lyse optimisé.

La figure 3.10 présente une visualisation par microscope optique d'un échantillon sanguin (i) avant (dilué 40 fois dans du NaCl 0,9%) et (ii) après la lyse (Protocole optimal N°7). Ces images sont obtenues à l'aide d'un microscope optique (Zeiss). La figure de gauche présente une solution témoin où toutes les cellules sanguines sont intactes. Après l'application du protocole de la lyse, toutes les cellules sanguines sont lysées (figure 3.10 (ii)).

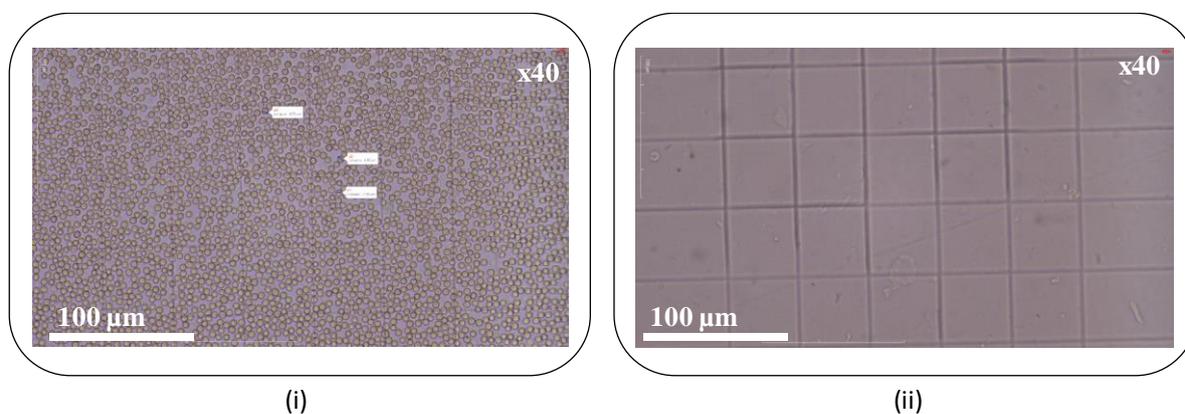


Figure 3. 10 L'échantillon sanguin (i) avant et (ii) après la lyse (dilution au 40^{ème} des solutions 1 et 5)

En conclusion, nous avons réussi à lyser la totalité des cellules sanguines au moyen d'un traitement par la saponine à 1% m/v associé à un choc osmotique (volumes sang : saponine : eau valant 1 :1 :2).

N.B : Pour préparer la solution mère de saponine, nous avons mélangé 2.5 g de saponine en poudre (chez Sigma Aldrich) dans 50 mL d'eau déionisée afin d'obtenir une solution à une concentration de 5% m/v. Nous avons fait des dilutions de la solution mère pour obtenir des solutions diluées à différentes concentrations.

2 Détermination du pouvoir lytique de la saponine et/ou de l'eau à l'échelle macroscopique sur les bactéries par cytométrie en flux

Il est important d'évaluer l'influence du protocole de lyse précédemment optimisé sur l'état physiologique des bactéries pour vérifier si celui-ci ne les altère pas. Zelenin *et al.* [2] ont montré dans leurs travaux qu'une faible concentration de saponine (entre 0,5 et 1%) n'influe pas sur la viabilité des bactéries. Nous avons donc cherché à vérifier si l'intégrité des bactéries *E. Coli* était conservée dans nos conditions expérimentales. La première partie de cette section présente les étapes de préparation d'une suspension bactérienne marquée. Dans la seconde partie, je détaillerai les tests que j'ai effectués afin d'étudier l'effet de la saponine sur la viabilité des bactéries.

2.1 Protocole de culture bactérienne

La culture bactérienne est une technique de laboratoire de développement contrôlé des bactéries, croissance *in vitro*, en principe d'une seule souche bactérienne. Les souches sont conservées à 80°C, et étalées sur des boîtes de culture (Thermo Fisher), puis placées dans un incubateur à 37°C pendant 24h pour que des colonies isolées se forment. Ces boîtes servent de réserve pour conserver des colonies vivantes pendant 3 semaines à 4°C. Décrivons ici les principales étapes de la culture bactérienne sur des boîtes de TSA (Trypticase soy agar), nutriment qui favorise dans nos conditions la prolifération et la croissance des bactéries.

2.2 Préparation des boîtes de culture

La préparation des boîtes de culture se fait toujours suivant le protocole suivant (voir figure 3.11) :

- Gratter délicatement à l'aide d'un cône, un très petit échantillon de la suspension congelée à - 80°C (dans notre cas, suspension congelée d'*Escherichia coli* K12).
- Déposer cet échantillon sur la partie supérieure de la boîte de Pétri
- Puis à l'aide d'un ensemenceur (öse), effectuer des **stries serrées** par la méthode des quadrants à la surface de la gélose (méthode d'ensemencement)
- Enfin, placer la boîte ensuite dans un incubateur à 37°C pendant 24h pour que des colonies isolées se forment (figure 3.11f).

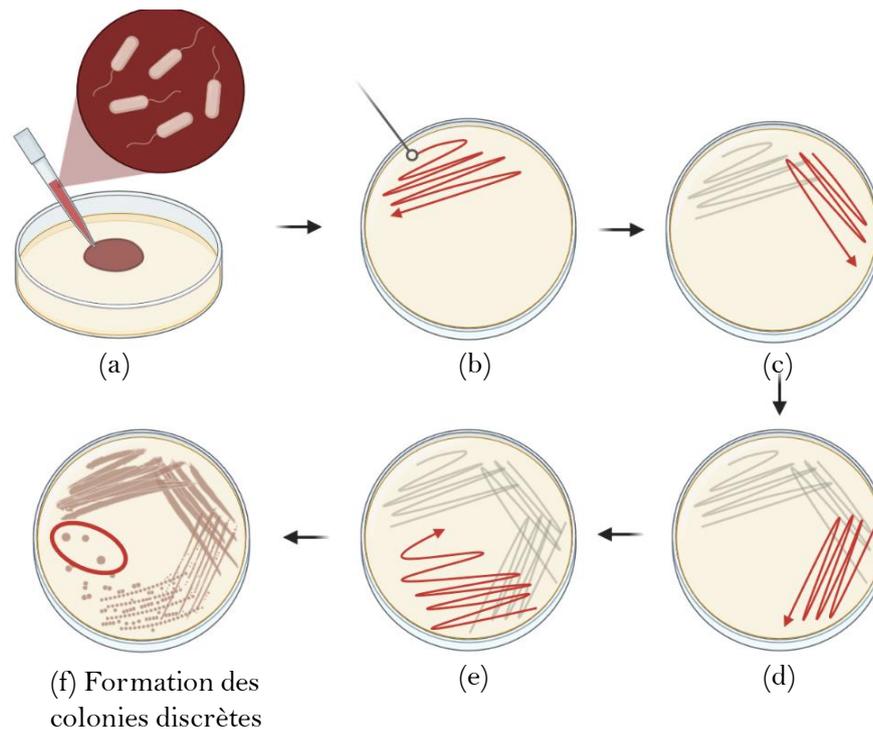


Figure 3. 11 Méthode d'ensemencement

2.3 Préparation de la suspension bactérienne

Après la préparation de la boîte de culture, nous prélevons 4 à 5 colonies isolées à l'aide de l'öse, et nous les dissocions sur la paroi interne d'un tube contenant 10 mL d'eau peptonée (Thermo Fisher scientifique, réf : BO0833M) jusqu'à l'obtention d'un léger trouble (figure 3.12). L'eau peptonée est un liquide de dilution et de rinçage qui contient des peptones à de faibles concentrations afin de fournir des nutriments pour la survie des microorganismes.

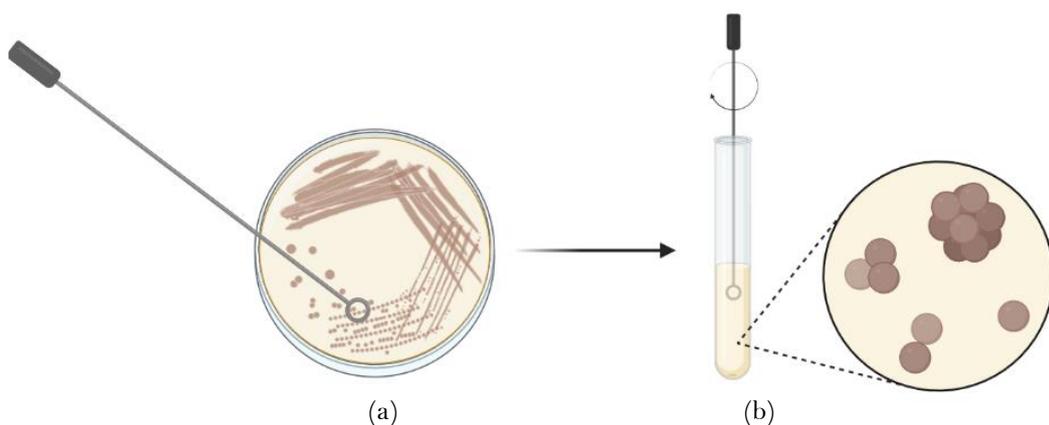


Figure 3. 12 Préparation de la suspension bactérienne

2.4 Protocole de marquage des bactéries

Afin d'étudier l'état physiologique des bactéries avant et après injection dans la puce microfluidique, nous avons utilisé un kit Live/Dead BacLight (Invitrogen). Ce kit contient du SYTO9 (fluorescent vert) et de l'iodure de Propidium IP (fluorescent rouge), qui sont des fluorochromes s'intercalant entre les acides nucléiques. Les cellules à membrane fragilisée qui sont considérées comme mortes ou mourantes sont teintées en rouge, alors que les cellules dont la membrane est intacte présentent une coloration verte.

Le protocole de marquage consiste à mélanger 1mL de la suspension bactérienne préparée dans la même journée avec 1,5 μL de solution de SYTO9 (de concentration 1,67 mM) et 1,5 μL de solution d'IP (de concentration 20 mM), puis de laisser incuber le mélange 15 minutes dans le noir à température ambiante.

Le SYTO9 (vert) peut pénétrer dans la cellule quel que soit l'état de la membrane, alors que l'IP (rouge) ne peut y pénétrer que si la membrane est endommagée.

La figure 3.13 montre une image prise par microscope à fluorescence d'une suspension bactérienne marquée par le kit Invitrogen. Les bactéries viables sont marquées en vert, tandis que les bactéries mortes sont marquées en rouge ce qui signifie que leurs membranes sont endommagées.

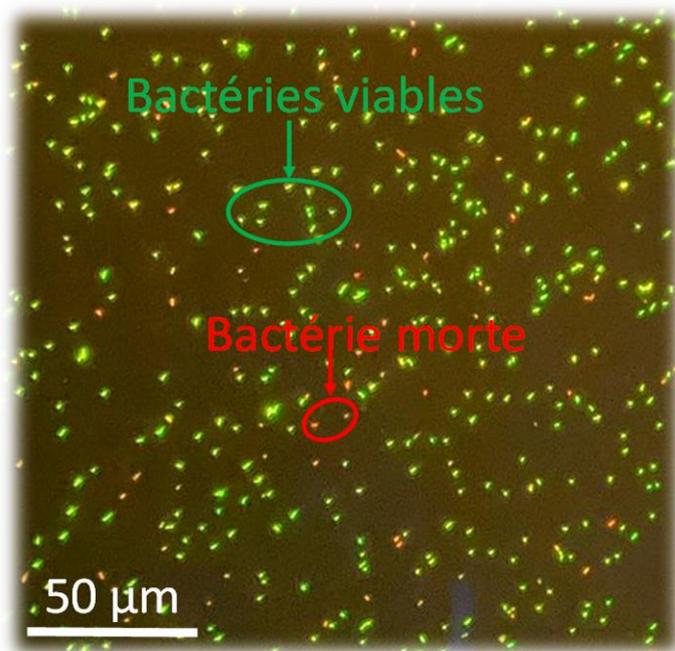


Figure 3. 13 Photographie en microscopie de bactéries (*Escherichia coli*) marquées avec le Syto 9 et l'IP.

2.5 Dénombrement des bactéries dans une suspension mère

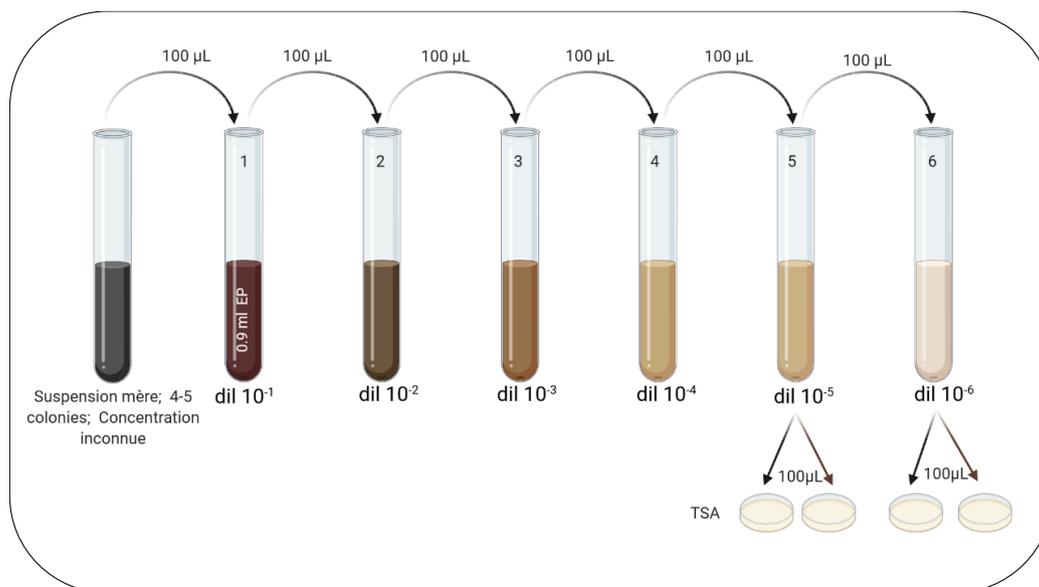


Figure 3. 14 Protocole de dilutions décimales

Pour connaître le nombre de micro-organismes dans un échantillon, une méthode standard de laboratoire consiste à effectuer un comptage sur boîte. Cette méthode consiste à préparer des dilutions décimales de la suspension mère préparée selon le protocole mentionné dans la section 2.2 (voir figure 3.14).

Préparation des dilutions décimales :

- Dans 6 tubes Eppendorf stériles numérotés de 1 à 6, introduire 900 µL d'eau peptonée
- Prélever 100 µL de la suspension bactérienne et l'introduire dans le tube 1. Agiter sur agitateur Vortex. On obtient la dilution 10^{-1} de la suspension mère
- **A l'aide d'une nouvelle pipette**, transférer 100 µL de cette dilution dans le tube 2. Agiter sur agitateur Vortex. On obtient la dilution 10^{-2} de la suspension mère
- Opérer de même jusqu'à obtention de la dilution 10^{-6} de la suspension mère
- Seules les dilutions 10^{-5} et 10^{-6} sont mises en culture. Dans 2 boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé, déposer 100 µL de la dilution 10^{-5} et dans deux autres boîtes, déposer 100 µL de la dilution 10^{-6}
- Etaler de façon homogène et jusqu'à absorption des dilutions à l'aide d'un étaleur en L
- Mettre les boîtes à l'étuve (à 37 °C), **couvercles en dessous**.

Chaque micro-organisme isolé sur la surface gélose va former une colonie visible à l'œil nu (figure 3.14). Le dénombrement des colonies sur la boîte permet de remonter au nombre de

micro-organismes dans l'échantillon de départ. Après 24h d'incubation, on compte les colonies qui se sont développées dans les boîtes afin de calculer le nombre d'UFC/mL de suspension en effectuant la moyenne pondérée à l'aide de l'équation 33 :

$$N = \frac{\sum c}{V \times (n_1 + 0.1 \times n_2)} \times \frac{1}{d} = \dots \text{UFC/ml (dans la suspension mère)} \quad \text{Équation 33}$$

Où

- $\sum c$: somme totale de colonies comptées sur les boîtes de pétri
- V = volume de dilution introduit dans chaque boîte = 100 μL
- n_1 = nombre de boîtes à la plus faible dilution (10^{-6}) = 2
- n_2 = nombre de boîtes à la plus forte dilution (10^{-5}) = 2
- $1/d$ = plus fort facteur de dilution = $1/10^{-6} = 10^6$

UFC : une unité formatrice de colonie (UFC) est utilisée pour estimer le nombre de bactéries ou de cellules fongiques viables dans un échantillon. La viabilité est définie comme la capacité de se multiplier *via* la fission binaire dans des conditions contrôlées.

La figure 3.15 présente les 4 boîtes de pétri après incubation 24h.

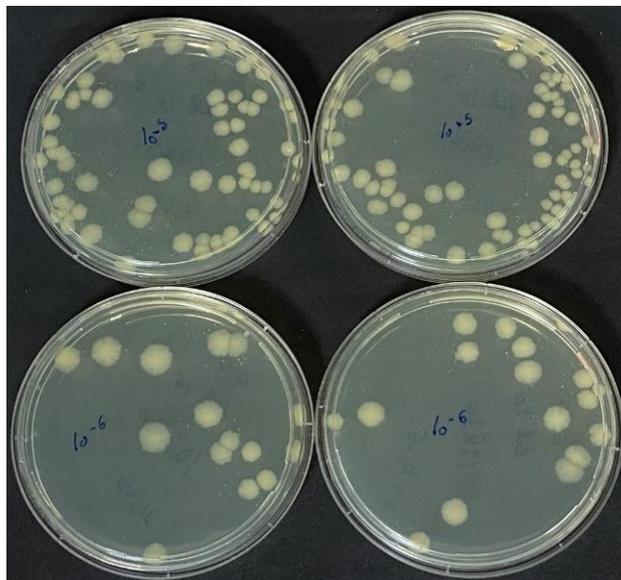


Figure 3. 15 boîte de culture après 24h d'incubation à 37 degrés.

En appliquant la formule de l'équation 33, le nombre de bactéries viables dans la suspension

$$\text{mère est } N = \frac{155}{0.1 \times (2 + 0.1 \times 2)} \times \frac{1}{10^{-6}} = 3.6 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$$

2.6 Etude l'effet de la saponine sur la viabilité des bactéries

Afin d'étudier la viabilité des bactéries en fonction de la concentration de la saponine, des suspensions bactériennes marquées par le Syto 9 et l'IP de concentration de 10^8 UFC/mL ont été mélangées individuellement avec des volumes égaux de saponine dont la concentration varie de 1 à 5% et incubées pendant 2 minutes à température ambiante. Les solutions finales ont été analysées à l'aide de la cytométrie en flux.

Les matrices regroupées dans la figure 3.16 ci-dessous présentent une acquisition en Forward Scattering (FSC) et en complexité (SSC) permettant à la fois de classer les bactéries en fonction de leur taille et de leur complexité.

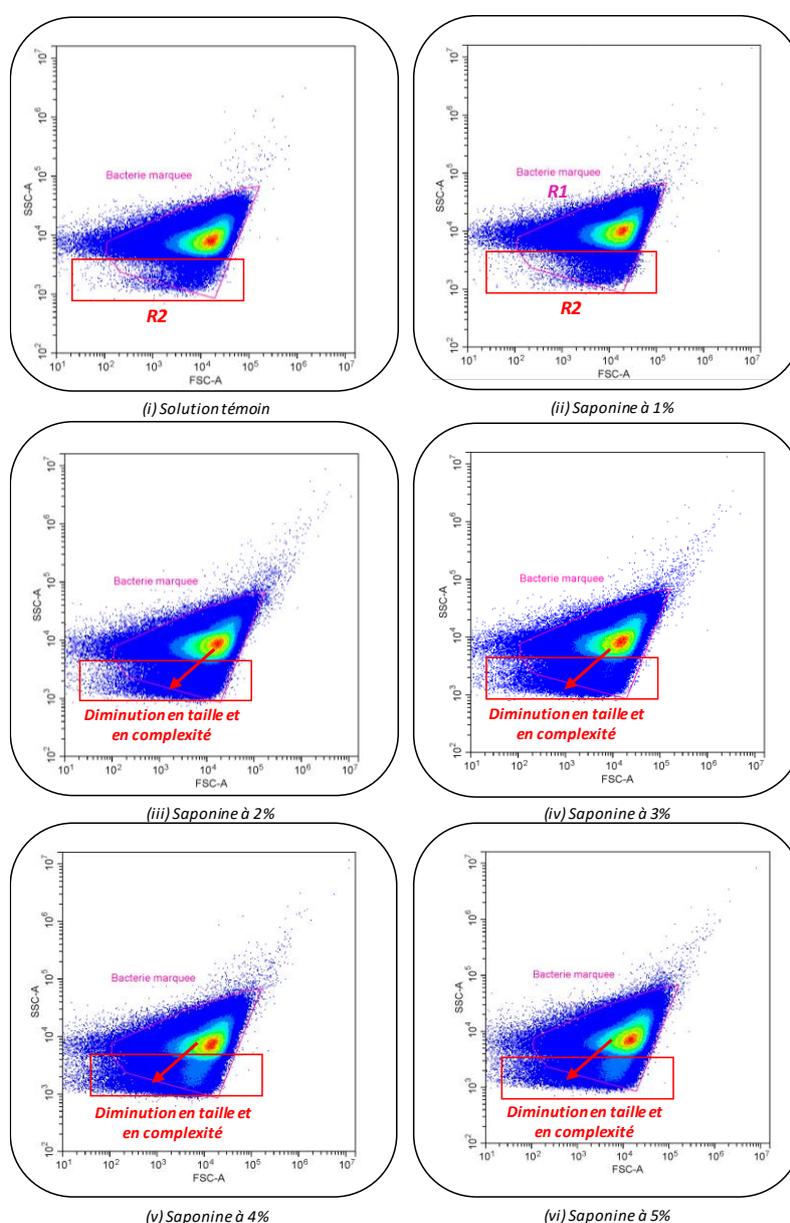


Figure 3. 16 Matrices représentant la complexité interne de la bactérie en fonction de leur taille.

Nous avons suivi la viabilité des bactéries pendant les 6 minutes suivant l'exposition à la saponine. Le suivi a été fait par deux méthodes :

- 1) en étudiant la région R2 qui permet d'observer l'apparition des débris (les bactéries diminuent en taille et en complexité)
- 2) en suivant la diminution de la fluorescence du fluorophore Syto 9 qui marque uniquement les bactéries viables.

Nous remarquons que lorsque la concentration de la saponine augmente, le nuage d'objets se déplace vers la gauche et passe la région R1 à la région R2, traduisant une diminution de la taille et de la complexité des bactéries (figure 3.16).

Nous considérons que ce déplacement traduit la mort des bactéries sous l'action de la saponine. L'intensité de la fluorescence verte du Syto9 dans chaque région permet de tracer les courbes représentant le pourcentage des bactéries viables en fonction des concentrations de saponine (figure 3.17 (i)).

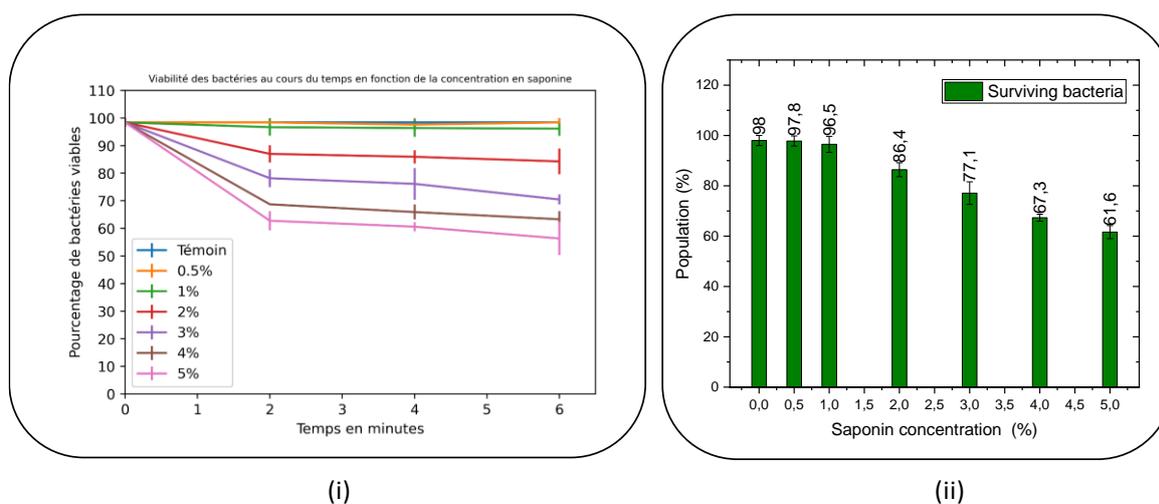


Figure 3. 17 (i) Suivi de la viabilité des bactéries au cours du temps en fonction de la concentration en saponine.
(ii) Pourcentage des bactéries en fonction de la concentration en saponine

D'après cette courbe, nous remarquons que la viabilité des bactéries diminue lorsque la concentration en saponine augmente. A $t=0$ min, le pourcentage de bactéries viables est d'environ $\sim 100\%$ dans les sept solutions. Ce pourcentage reste constant au cours du temps pour les deux premières solutions (courbe bleue qui représente la solution témoin et courbe orange représentant la solution contenant de la saponine à 0,5 %).

La figure 3.17 (ii) représente le pourcentage de bactéries survivantes en fonction de la concentration en saponine après 2 min d'incubation à température ambiante. Nous remarquons que la viabilité des bactéries diminue de 100% jusqu'à 61,6% en augmentant la concentration en saponine de 1% à 5% respectivement.

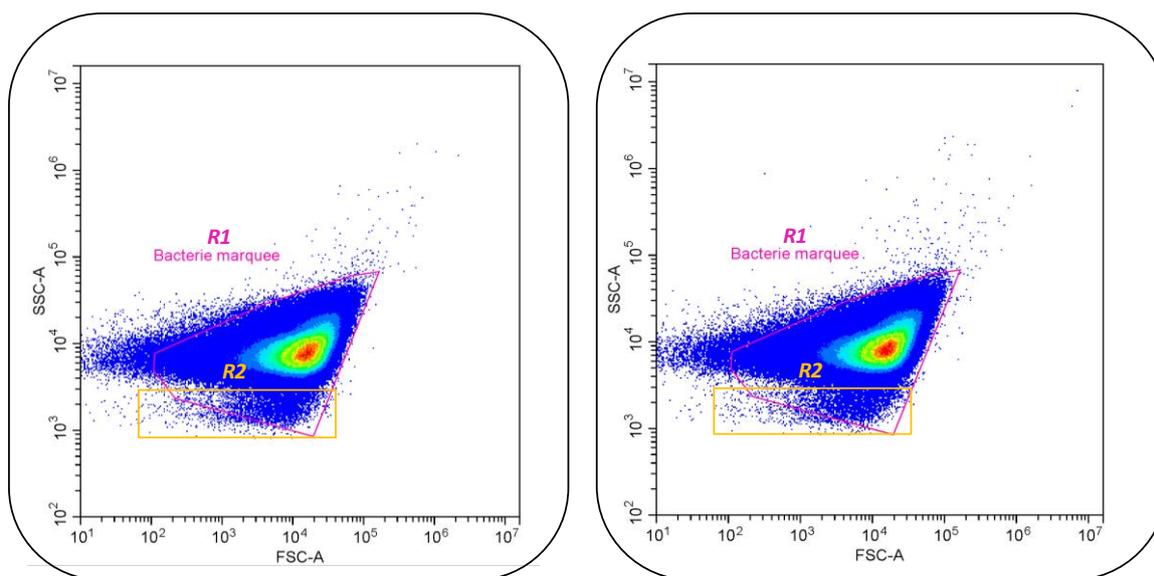
En s'appuyant sur ces résultats, nous avons choisi pour la suite des travaux de sélectionner une concentration en saponine égale à 1% m/v de façon à lyser les cellules sanguines de façon efficace tout en maintenant l'état physiologique des bactéries. Ceci est en cohérence avec les travaux de Zelenin *et al.* [2] mentionnant qu'une faible concentration de saponine à 1% n'a pas d'influence sur la viabilité des bactéries.

2.7 Effet du choc osmotique sur les bactéries

Une simple visualisation par microscope optique des micro-organismes ne permet pas d'étudier les effets de l'osmolarité du milieu sur la viabilité des bactéries. Afin de mettre en évidence ces effets éventuels, nous avons marqué les bactéries selon le protocole décrit précédemment dans la section 2.4, qui permet de visualiser la perméabilisation de leur membrane. La figure 3.13 montre que les deux marqueurs fluorescents ont pu s'intercaler dans les noyaux des bactéries lorsqu'elles sont en suspension dans l'eau peptonée, puisqu'à la fois les deux marquages vert et rouge sont observés indiquant que leur membrane est perméabilisée.

Afin de vérifier que cette perméabilisation n'a aucune influence sur la viabilité des bactéries, ces dernières ont été mises en contact pendant 6 min avec un tampon isotonique (eau peptonée) ou hypotonique (eau déionisée) puis analysées à l'aide de la cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de bactéries ayant résisté au choc osmotique.

Les matrices ci-dessous présentent une acquisition en Forward Scattering (FSC) et en complexité (SSC) pour deux suspensions bactériennes marquées (3.18i) avant et (3.18ii) après l'exposition à l'eau déionisée.



(i) Bactéries marquées dans l'eau peptonée

(ii) Bactéries marquées dans l'eau déionisée

Figure 3. 18 Matrices des deux suspensions bactériennes marquées (i) avant et (ii) après l'exposition à l'eau.

Nous remarquons que le nombre d'objets dans la région R2 avant et après l'exposition à l'eau déionisée est identique, ce qui signifie que l'eau n'a pas d'effet sur la viabilité des bactéries. L'intensité de la fluorescence verte du Syto9 dans chaque région permet de tracer les courbes de pourcentage des bactéries viables au cours temps après l'exposition à l'eau déionisée (figure 3.19).

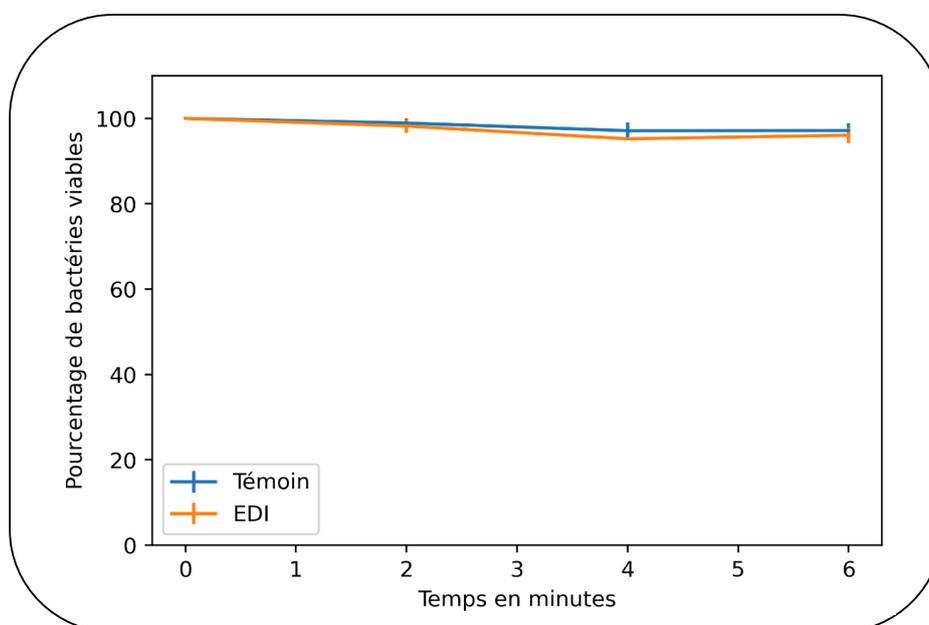


Figure 3. 19 Suivi de la viabilité des bactéries au cours du temps après l'exposition à l'eau

Les courbes montrent que le pourcentage de bactéries viables reste proche de 100% en milieu hypotonique sur une durée de 6 min.

En conclusion, les analyses par cytométrie en flux de solutions sanguines et de solutions bactériennes, présentées dans la partie 2 de ce chapitre, ont révélé que toutes les cellules sanguines sont complètement lysées, tandis que les bactéries restent viables lorsqu'elles sont soumises à l'effet d'une solution de saponine 1% m/v associée à un choc osmotique.

Cependant, pour lyser les cellules bactériennes, où plusieurs couches enferment le contenu cellulaire, il faut d'abord briser la paroi cellulaire externe pour rompre la membrane cellulaire. Une bactérie gram négative contenant deux membranes (interne et externe) va donc nécessiter une concentration de saturation C_{sat} de saponine plus élevée que celle des cellules sanguines (qui contiennent une seule membrane cytoplasmique) pour être lysée.

Une concentration de saponine plus faible (0,5 %) entraîne une lyse incomplète des cellules sanguines, et une concentration de saponine plus élevée (2 %) entraîne une diminution de la viabilité des bactéries (86,4%). Par conséquent, nous avons sélectionné pour la suite des travaux au sein des dispositifs microfluidiques, la concentration de 1% m/v en détergent pour obtenir une lyse sélective des cellules sanguines, sans endommager les bactéries, en accord avec les travaux de Zelenin [2].

3 Optimisation du module de lyse sanguine en microfluidique

Après avoir étudié la lyse des cellules sanguines à l'échelle macroscopique, nous avons cherché à transférer ce protocole dans une puce microfluidique.

Plusieurs géométries de circuits microfluidiques permettant le mélange des différents fluides et réactifs ont été conçues. Dans cette partie, nous décrivons l'évolution des géométries du dispositif dans un but d'optimisation des mélanges, avec d'abord le mélange **sang/saponine** puis le mélange **sang lysé/eau**. Pour optimiser les mélanges, j'ai d'abord travaillé avec des solutions aqueuses contenant des colorants. Les conditions opératoires optimales ont ensuite été appliquées à la lyse du sang de cheval. Le but ici est d'obtenir une géométrie du module de lyse la plus adéquate possible pour lyser toutes les cellules sanguines en un minimum de temps avec le débit le plus élevé afin d'accélérer le traitement de l'échantillon et donc de permettre un diagnostic rapide de la septicémie.

3.1 Préparation des solutions

De façon à vérifier l'étanchéité des dispositifs fabriqués et évaluer leur capacité à mélanger des fluides introduits aux différentes entrées de la puce, j'ai effectué des tests fluidiques en utilisant des solutions aqueuses colorées.

Des colorants alimentaires jaune, rouge et bleu (chez Jeulin) ont été solubilisés dans de l'eau déionisée. Le sang de cheval défibriné a été acheté chez Thermo Fisher Scientific (produit n° SR0050C). La saponine a été achetée chez Quillaja Bark pure DAB (produit n° A4518,0100) et a été préparée dans de l'eau déionisée à une concentration de 1% m/v. Les solutions aqueuses, le sang défibriné, la solution de saponine et l'eau déionisée ont été pompés à travers le dispositif à l'aide d'un pousse-seringue (Nemesys, CETONI, Allemagne). Le comptage des cellules sanguines a été fait avec une cellule de Malassez (Marienfeld, Allemagne, profondeur 0,2 mm, 0,0025 mm²).

3.2 Banc expérimental

Le banc expérimental est décrit dans la figure 3.20. Dans un premier temps, les connexions fluidiques sont positionnées sur le dispositif microfluidique et les solutions sont injectées à l'aide d'un pousse-seringue (HARVARD APPARATUS). Les éventuelles fuites sont vérifiées pendant la première étape de rinçage avec du NaCl 0,9% m/v pendant 5 min. Le suivi du mélange dans les microcanaux a été effectué sous un microscope optique (Motic). Les images

ont été capturées par une caméra Motic (Moticam 1080), puis analysées à l'aide du logiciel Image live.

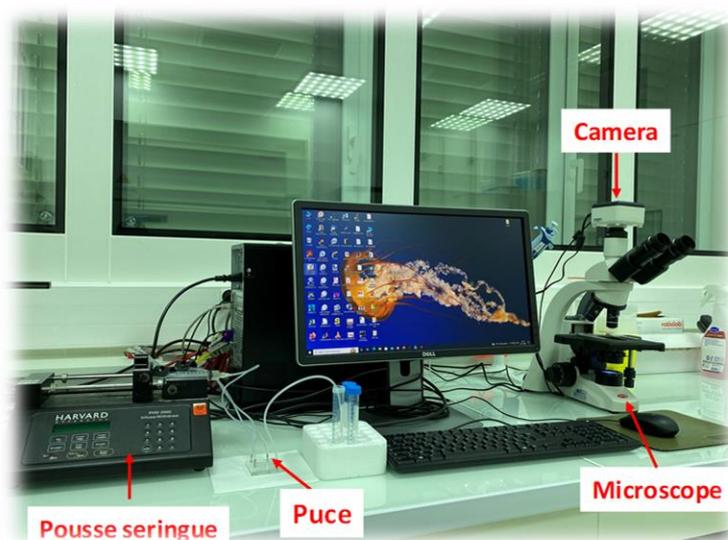


Figure 3. 20 Banc expérimental

3.3 Designs 1-2

Les puces conçues pour effectuer la lyse d'un échantillon sanguin présentent 3 entrées : l'une pour l'introduction du sang, la seconde pour celle de la saponine et la 3^{ème} pour l'ajout d'eau déionisée. Les circuits fluidiques sont en forme d'un serpentín pour faciliter le mélange des fluides. Ils sont composés de deux parties : 1) partie sang-saponine (circuit entre l'entrée de la saponine et l'entrée d'eau) et 2) partie eau-sortie (circuit entre l'entrée de l'eau et la sortie de la puce).

Dans un premier temps, nous avons proposé une première série de dessins de circuits microfluidiques comme montré sur la figure 3.21 (i), (ii) adaptés du protocole de Zelenin [2]. Nous avons fait varier la largeur et la longueur des canaux ainsi que le diamètre des réservoirs selon 2 designs :

- Design 1 : largeur des canaux 500 μm , hauteur 100 μm , rayon des réservoirs 2 mm.
- Design 2 : largeur des canaux 1000 μm , hauteur 100 μm , rayon des réservoirs 3 mm.

Des tests fluidiques avec des solutions aqueuses colorées sont effectués sur ces premières puces afin d'étudier leur capacité à mélanger les fluides introduits (cf figure 3.21 (iii), (iv)).

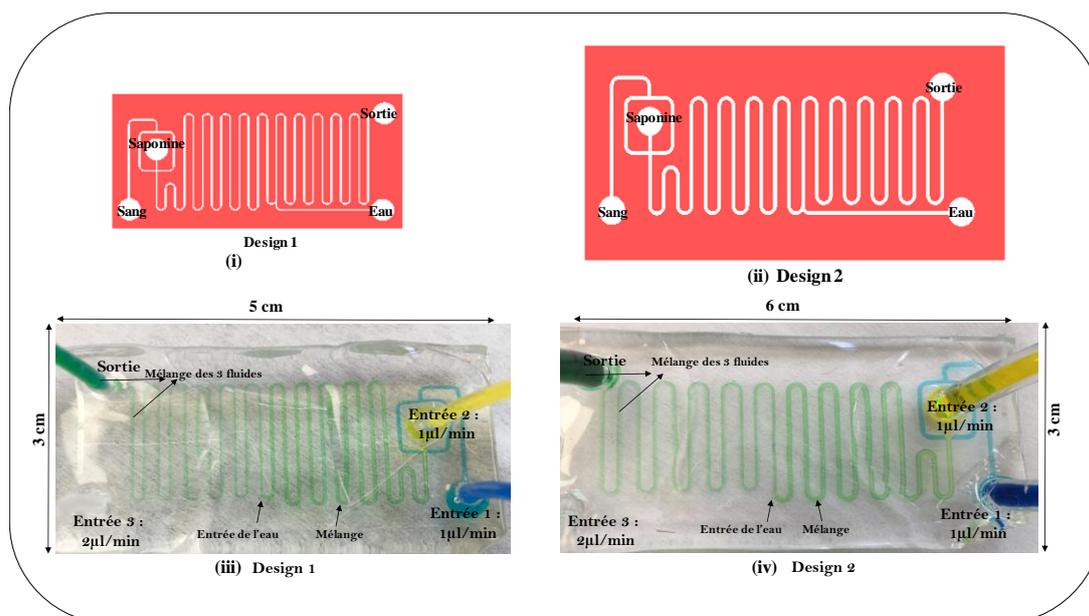


Figure 3. 21 Design L-edit du circuit microfluidique, avec (i) Design 1 : largeur des canaux $500\ \mu\text{m}$, hauteur $100\ \mu\text{m}$ (ii) Design 2 : largeur des canaux $1000\ \mu\text{m}$, hauteur $100\ \mu\text{m}$. (iii) Tests fluidiques avec des solutions aqueuses colorées sur le design 1. (iv) Tests fluidiques avec des solutions aqueuses colorées sur le design 2. Les deux structures bicouches sont réalisées avec le collage humide PDMS/hexane.

Les débits testés ont varié de 1 à $300\ \mu\text{L}/\text{min}$. Afin de respecter le même rapport de volume des fluides mélangés que celui utilisé pour effectuer la lyse à l'échelle macroscopique (1 : 1 : 2), le débit appliqué dans l'entrée 3 est toujours égal au double du débit appliqué dans les entrées 1 et 2. Pour la majorité des expériences, le colorant bleu a été introduit au niveau de l'entrée 1 (entrée prévue pour le sang) ; le colorant jaune a été introduit au niveau de l'entrée 2 (entrée prévue pour la solution de saponine) ; l'eau déionisée (ou le colorant rouge) a été introduite au niveau de l'entrée 3 (entrée prévue pour l'eau déionisée).

Le débit optimal Q pour obtenir une solution homogène à la sortie de la puce est $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ pour les deux premières entrées (colorant bleu et colorant jaune) et $2\ \mu\text{L}/\text{min}$ pour la troisième (eau). Ce débit était similaire pour les deux designs 1 et 2, ce qui signifie que l'augmentation de largeur des canaux n'a pas eu d'incidence positive sur l'augmentation en débit. L'application d'un débit plus élevé empêche l'obtention d'un mélange homogène à la sortie de la puce.

En conclusion, le débit de $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ est trop faible pour traiter rapidement 20 mL de sang, ce qui ne correspond pas à notre objectif.

3.4 Designs 3-4

Afin d'augmenter le débit des fluides introduits dans les différentes entrées de la puce, et d'obtenir une solution homogène à la sortie de la puce, nous avons pensé à augmenter le nombre de coudes du circuit microfluidique. Nous avons alors proposé deux autres designs, designs 3 et 4, qui sont respectivement décrits dans les figures 3.22(i) et 3.22(ii)).

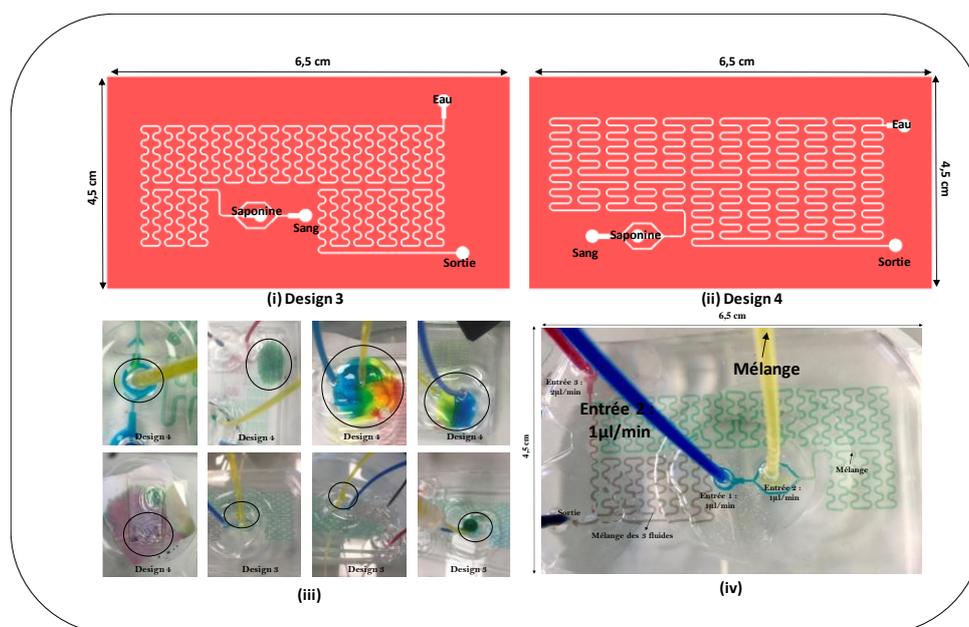


Figure 3. 22. Design L-edit du circuit microfluidique, avec (i) Design 3 : largeur des canaux $w= 500 \mu\text{m}$, hauteur $h= 100 \mu\text{m}$. (ii) Design 4 : largeur des canaux $1000 \mu\text{m}$, hauteur $100 \mu\text{m}$. (iii) Photos des puces endommagées à cause d'une fuite. (iv) Tests fluidiques avec des solutions aqueuses colorées. La structure bicouche est réalisé avec le collage humide PDMS/hexane

Pendant les premiers tests fluidiques, lorsqu'on applique des débits élevés, toutes les puces présentant le design 4 ont été endommagées à cause d'une fuite soit au niveau des connectiques, qui se détachent, soit au niveau de la zone du collage PDMS/ Hexane. Le même problème s'est produit avec les puces présentant le design 3 (cf figure 3.22(iii)), et nous n'avons pas réussi à obtenir une seule puce qui fonctionne. Il faut mentionner que pour les premiers dispositifs, les connectiques fluidiques étaient directement intégrées dans les trous percés préalablement dans les capots en PDMS, puis fixées à l'aide d'un dépôt d'une solution de PDMS autour de ces connectiques comme cela est illustré dans la figure 3.22(iv).

Le débit optimal est ici de $10 \mu\text{L}/\text{min}$ pour les deux premières entrées (sang et saponine) et de $20 \mu\text{L}/\text{min}$ pour la troisième (eau). Ce débit reste toujours insuffisant pour traiter 20 mL de sang en un temps rapide (cf figure 3.22(iv)).

Dans ce contexte, nous avons décidé d'augmenter le débit en augmentant la longueur du circuit microfluidique après l'entrée de l'eau pour obtenir la géométrie du design 5 présentée dans la section suivante.

3.5 Design 5

Sur la base de nos premières expériences avec les dispositifs de design 3, nous avons encore modifié le dessin pour proposer la géométrie de design 5. La longueur du circuit microfluidique après l'entrée de l'eau est devenu plus long, ce qui a augmenté également le nombre des coudes dans le circuit microfluidique (voir figure 3.23). Nous avons changé aussi les connectiques afin de résoudre le problème de fuite au niveau tubulaire.

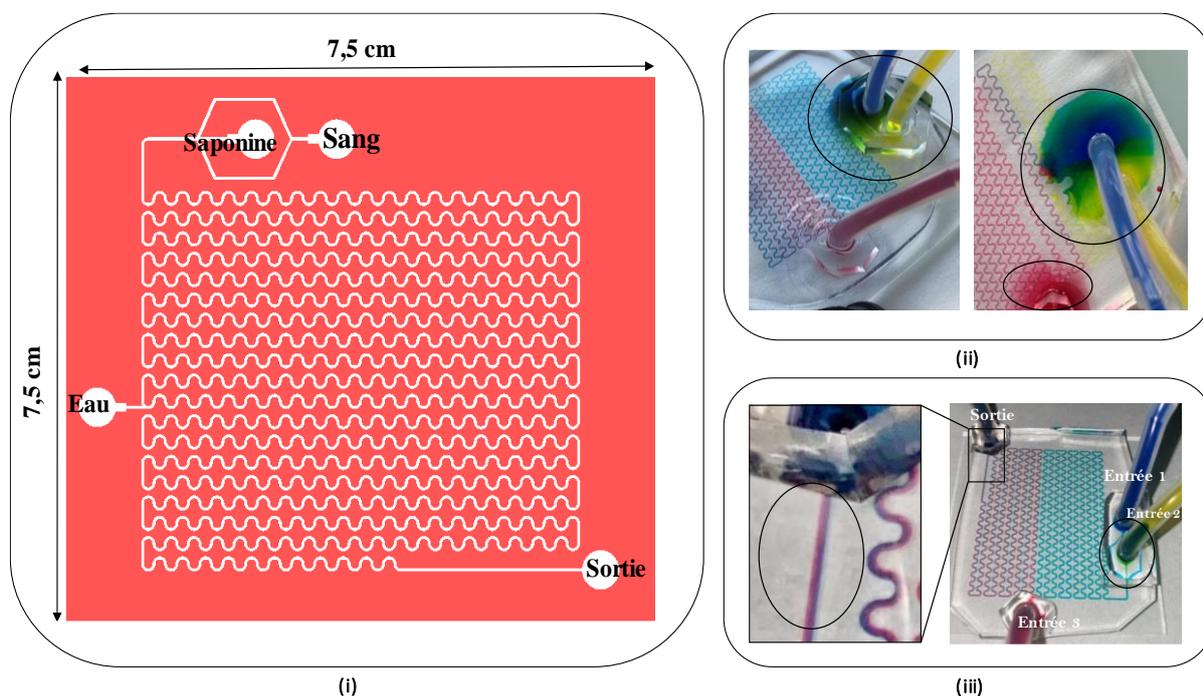


Figure 3. 23. (i) Design L-edit du circuit microfluidique, avec largeur des canaux 500 μm , hauteur 100 μm . (ii) Photos des puces endommagées à cause d'une fuite. (iii) Photos des puces sous écoulement fluide

On remarque lors des tests fluidiques que lorsqu'on applique des débits élevés, la plupart des puces sont décollées (voir figure 3.23 (ii)). Ce problème peut être lié aux conditions de fabrication en salle blanche qui peuvent varier d'un jour à l'autre comme la température, la pression, l'humidité, etc... Nous avons réussi à obtenir deux puces fonctionnelles selon ce design. Les résultats des tests fluidiques sont présentés dans la figure 3.23 (iii). À partir des résultats des tests fluidiques, on constate que si les débits appliqués dans l'entrée 1 et 2 sont égaux, il y a toujours un fluide qui empêche l'écoulement de l'autre quel que soit le débit testé (voir figure 3.23 (iii)). Malgré l'augmentation de la longueur de circuit après l'entrée de l'eau, nous n'avons pas réussi à augmenter le débit au-delà de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour les deux premières entrées (colorant bleu et colorant jaune) et 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour la troisième (colorant rouge).

3.6 Design 6

Sur la base des tests fluidiques effectués sur les dispositifs de design 5, et afin de faciliter le mélange des fluides introduits aux différentes entrées de la puce, nous avons modifié la géométrie pour l'entrée de l'eau. La nouvelle géométrie est similaire à celle de l'entrée de la saponine. Elle s'appelle « **géométrie en flow-focusing** » (voir figure 3.24(i)), elle contribue à la diminution du temps de mélange en focalisant le flux d'un des deux fluides à mélanger [117], [118], [119], [120].

La géométrie d'un système microfluidique en **flow-focusing** est généralement déterminée par quatre paramètres : la largeur du canal central (W_c), la largeur du canal latéral (W_l), la profondeur du canal (h) et l'angle d'intersection (α) entre le canal central et le canal latéral [120].

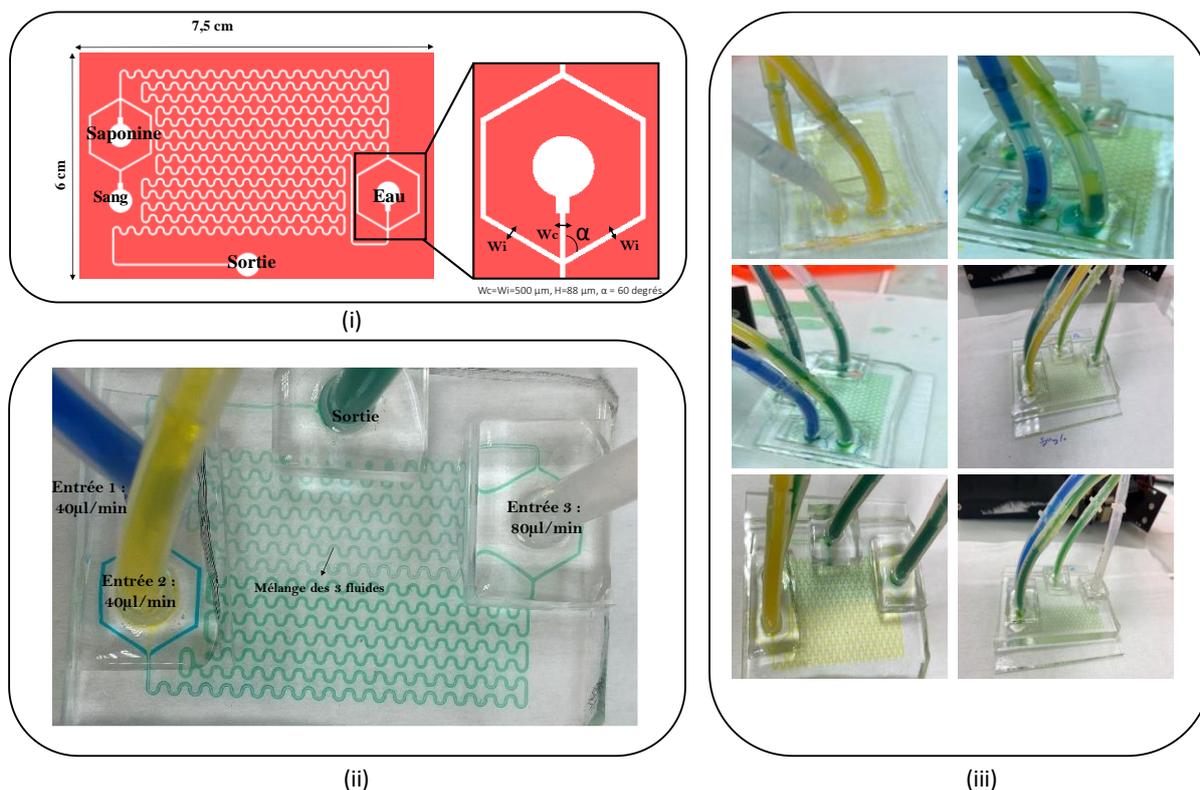


Figure 3. 24. (i) Design L-edit du circuit microfluidique avec la géométrie flow-focusing ; $W_c=W_l=500 \mu\text{m}$, $h=100 \mu\text{m}$, $\alpha = 60^\circ$. (ii) Photos des puces sous écoulement fluide, le débit optimal appliqué sur ce design est $40 \mu\text{L}/\text{min}$ pour les deux premières entrées (sang et saponine) et $80 \mu\text{L}/\text{min}$ pour la troisième (eau). (iii) Photos des puces sous écoulement fluide.

Le débit optimal appliqué sur ce design est $40 \mu\text{L}/\text{min}$ pour les deux premières entrées (sang et saponine) et $80 \mu\text{L}/\text{min}$ pour la troisième (eau) (cf figure 3.24(ii)). Un débit plus élevé va

créer une différence de pression qui obstrue le passage des fluides l'un par rapport à l'autre (cf figure 3.24(iii)).

3.7 Design 7 – la géométrie optimale

Afin de réduire la différence de pression créée dans les jonctions flow-focusing, nous avons retardé l'injection du colorant bleu dans la puce en augmentant la longueur du circuit entre l'entrée 1 et la 1^{ère} jonction flow-focusing. Nous avons augmenté l'angle d'intersection (α) entre le canal central et le canal latéral dans la jonction flow-focusing pour atteindre une valeur $\alpha = 90^\circ$. De plus, nous avons diminué le nombre des coudes jusqu'à 91 coudes afin de minimiser au maximum la surface de la puce. La figure 3.25 présente le dernier design L-Edit conçu.

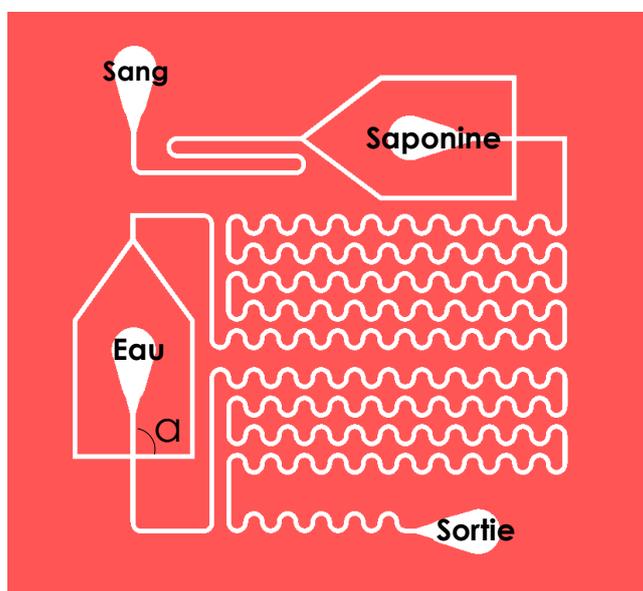


Figure 3. 25. Design L-edit du circuit microfluidique avec la géométrie flow-focusing ; $W_c=W_i=500 \mu\text{m}$, $h=100 \mu\text{m}$, $\alpha = 90^\circ$

Pour ce dernier design, les connectiques fluidiques ont été directement intégrées dans les trous percés préalablement dans les capots en PDMS en utilisant des connecteurs en acier inoxydable (« Stainless steel straight PDMS couplers » de Darwin Microfluidics), de diamètre de 1 mm. Pour cette raison, nous avons aussi changé le diamètre des réservoirs.

3.7.1 Tests fluidiques du circuit mélangeur de la géométrie 7

Pour un débit Q de $10 \mu\text{L}/\text{min}$ dans les entrées 1 et 2 ($20 \mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 3 puisque c'est le double), il n'y a pas de mélange des colorants bleu et jaune (cf figure 3.26 (i)). De même pour

un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, il n'y a toujours pas de mélange homogène des solutions (cf figure 3.26 (ii), (iii), (iv)).

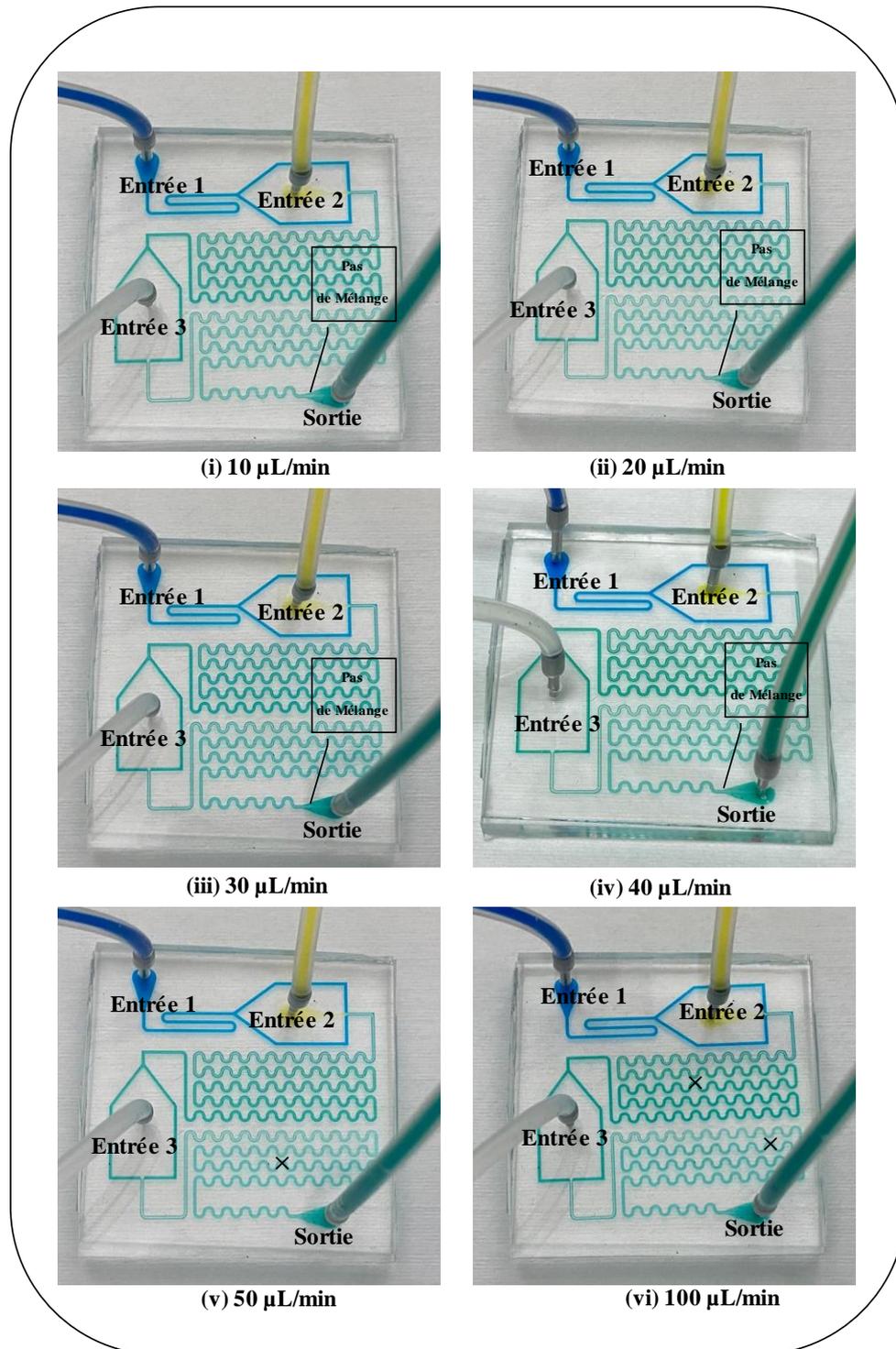


Figure 3. 26 Résultats des tests fluidiques à différents débits.

Pour un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans les entrées 1 et 2, le mélange se fait au bout du 16eme coude entre les trois colorants dans la partie eau-sortie. Avant l'injection d'eau, le colorant bleu et

le colorant jaune ne sont pas mélangés totalement (cf figure 3.26 (v)). **Le symbole X sur les images indique l'endroit où tous les fluides se mélangent.** Pour un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans les entrées 1 et 2 et de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 3 ($Q_1=Q_2=100 \mu\text{L}/\text{min}$, $Q_3=200 \mu\text{L}/\text{min}$), le mélange se fait au bout du 26eme coude entre le bleu et le jaune et, au bout du 13eme coude entre les trois fluides. Dans ces conditions, on arrive à récupérer un mélange homogène de trois solutions colorées à la sortie du dispositif (cf figure 3.26 (vi)).

Afin de traiter un volume important dans moins de temps possible, nous avons augmenté le débit jusqu'à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. Pour un débit de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans les entrées 1 et 2 et de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 3 ($Q_1=Q_2=150 \mu\text{L}/\text{min}$, $Q_3=300 \mu\text{L}/\text{min}$), le mélange se fait au bout du 15eme coude entre le bleu et le jaune et, au bout du 7eme coude entre les trois fluides (cf figure 3.27).

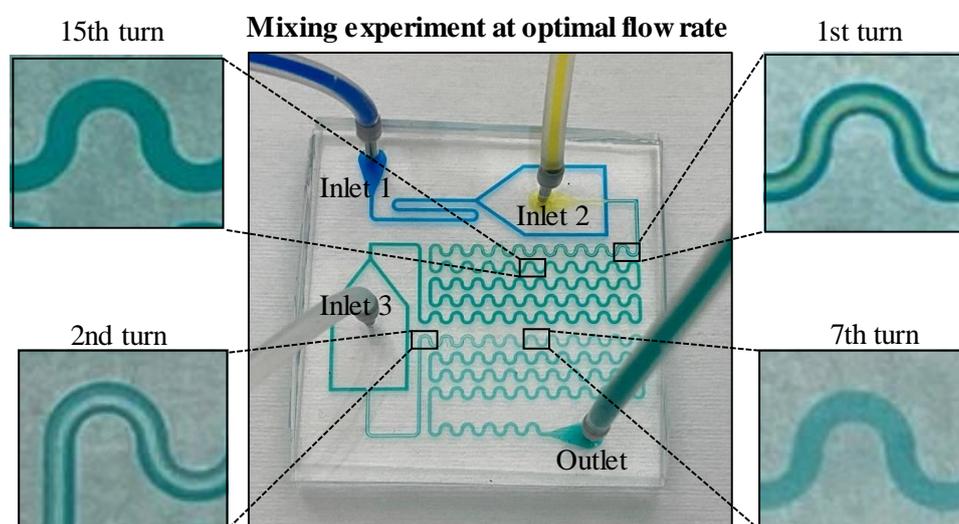


Figure 3. 27 Tests fluidiques avec des solutions aqueuses colorées

Ces résultats ont été confirmés par une simulation comsol 2D comme décrit dans la section suivante.

3.7.2 Simulation avec le logiciel COMSOL

Nous avons tenté de simuler le comportement des fluides à l'intérieur des microcanaux grâce au logiciel COMSOL Multiphysics. Ce logiciel permet de modéliser un grand nombre de lois physiques dans des géométries construites préalablement ou directement sur l'application. Pour nos simulations, nous avons utilisé principalement les modules "Ecoulement de Stokes" et "Transport d'espèces diluées". Nous avons simulé le mélange des fluides dans le module de la lyse afin de voir à partir de quelle distance le mélange des fluides est homogène. Dans toutes

les simulations, l'écoulement est caractérisé par un écoulement de Poiseuille à vitesse nulle aux parois du canal.

Pour simuler le mélange des fluides, il faut tout d'abord établir l'écoulement de Stokes à l'intérieur de la puce. Pour se faire, nous avons utilisé les grandeurs mises à notre disposition. La section du module de la lyse est de $100\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$. De plus, nous souhaitons obtenir un débit volumique de $150\ \mu\text{L}/\text{min}$ aux entrées du sang et de la saponine et un débit de $300\ \mu\text{L}/\text{min}$ pour l'entrée de l'eau déionisée. On peut alors déterminer la vitesse moyenne pour chacune des entrées. On aura alors une vitesse de $0,05\ \text{m/s}$ pour les entrées 1 et 2 et de $0,1\ \text{m/s}$ pour l'entrée 3. Pour finaliser la simulation, il faut entrer les caractéristiques des fluides entrants dans la puce. Pour la saponine et l'eau déionisée, on a défini leur masse volumique ainsi que leur viscosité similaire à celles de l'eau c'est à dire $\rho = 1000\ \text{kg.m}^{-3}$ et $\mu = 0,001\ \text{Pa.s}$. Quant à l'entrée 1 qui correspond au sang, on a choisi une masse volumique telle que $\rho = 1060\ \text{kg.m}^{-3}$ et sa viscosité telle que $\mu = 0,015\ \text{Pa.s}$ [121]. Toutes ces données ont été entrées dans le module "Transports d'espèces diluées" afin d'obtenir la simulation présentée sur la figure 3.28.

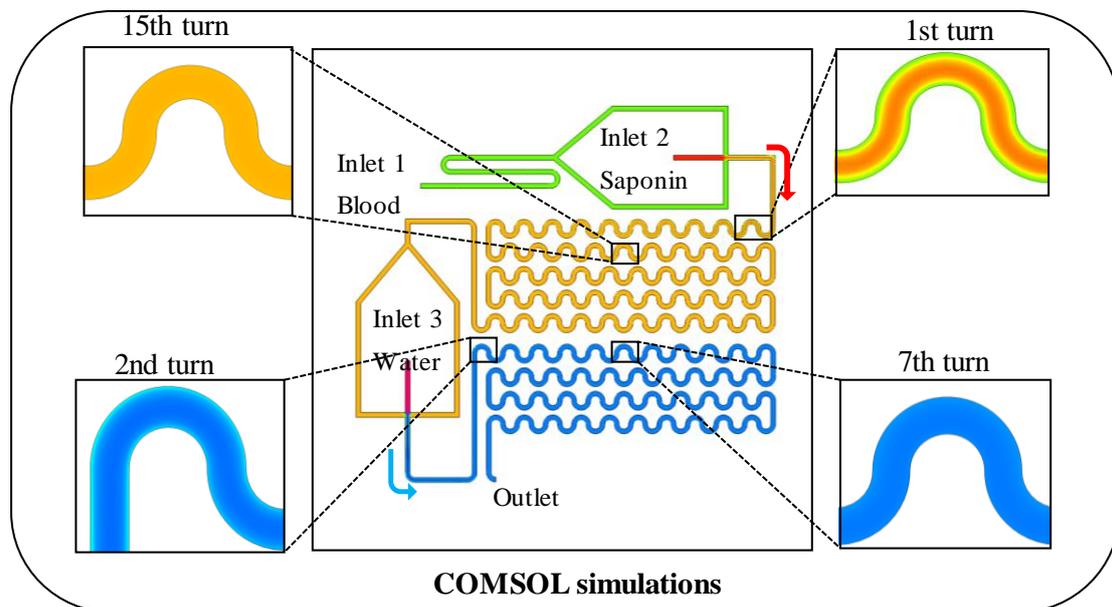


Figure 3. 28 Simulation Comsol 2D.

Le mélange se fait au bout du 15^{ème} coude entre les deux premiers fluides dans la partie sang-saponine et, au bout du 7^{ème} coude entre les trois fluides dans la partie eau-sortie. Ces résultats ont été confirmés expérimentalement. Ils sont en parfait accord avec les expériences décrites dans la section précédente (nombre de coudes expérimental et théorique identiques).

3.7.3 La lyse du sang de cheval à l'échelle microscopique

Après avoir déterminé les débits optimaux pour mélanger les fluides dans la puce en utilisant des solutions aqueuses colorées, nous avons appliqué le protocole de la lyse du sang optimisé à l'échelle macroscopique (section 1.2.1.3). Les débits totaux appliqués dans les entrées 1 (sang), 2 (solution de saponine) et 3 (eau) sont respectivement de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ (voir figure 3.29). Dans un premier temps, une étude de visualisation directe du lysat sur une lame de verre a été réalisée pour quantifier les débris cellulaires. La figure 3.30 montre des images de l'échantillon de sang (i) avant et (ii) après lyse. Ces images sont obtenues à l'aide d'un microscope optique (Motic). On constate que toutes les cellules sanguines sont lysées à la sortie de la puce. L'efficacité du processus de lyse a été évaluée à l'aide d'une chambre de comptage Malassez (voir Annexe 5) : le nombre de cellules comptées dans une zone de 0,0025 mm^2 (volume de 0.01 μL) a diminué d'un facteur 10000 après la lyse, ce qui signifie que la majorité des cellules sanguines sont lysées.

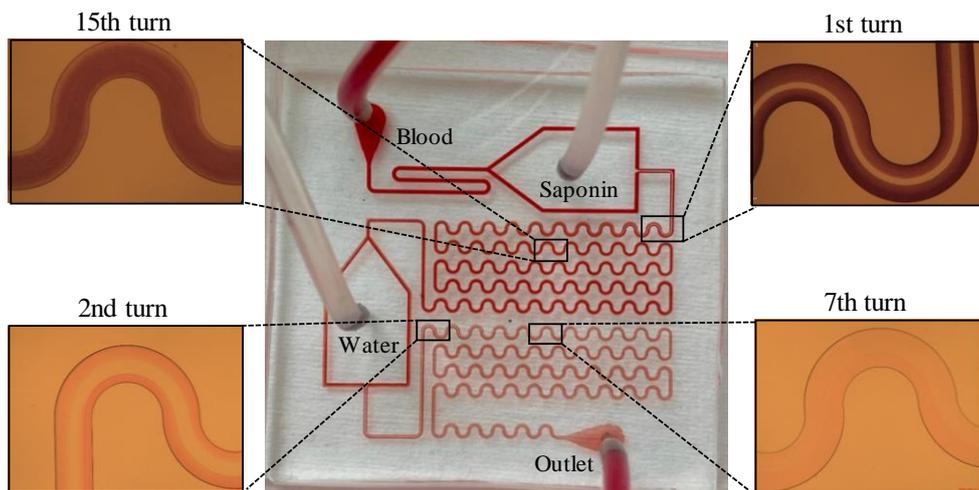


Figure 3. 29 Puce sous flux sanguin.

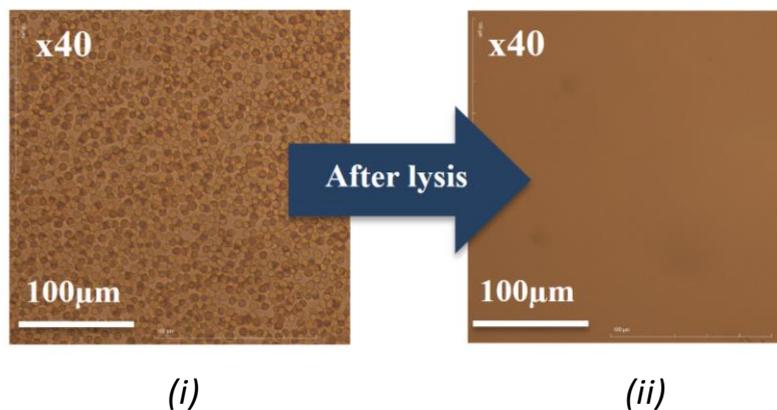


Figure 3. 30 Images par microscope optique de l'échantillon de sang (i) avant et (ii) après lyse.

Les lysats ont ensuite été analysés à l'aide du cytomètre en flux. Une matrice a été obtenue avec l'acquisition Forward Scattering (FSC) et la complexité (SSC) permettant de classer les cellules sanguines selon leur taille et leur complexité (figure 3.31).

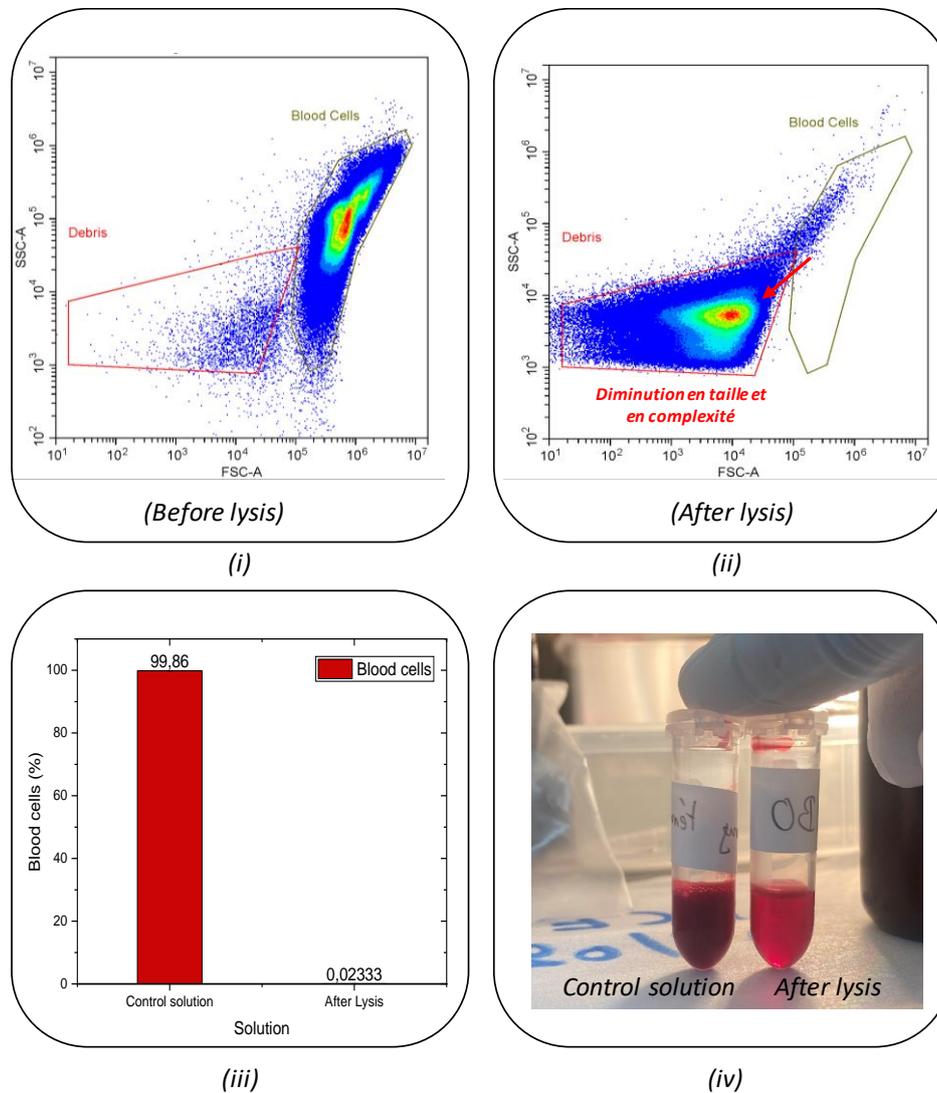


Figure 3. 31 (i-ii) Matrice avec acquisition de la diffusion directe (FSC) et de la complexité (SSC) permettant de classer les cellules sanguines selon leur taille et leur complexité , (iii) Pourcentage de cellules sanguines dans la solution avant et après lyse, (iv) Echantillon sanguin avant et après la lyse.

La première matrice à gauche (figure 3.31(i)) représente les cellules sanguines intactes avant lyse. Sur la deuxième matrice (figure 3.31(ii)), le nuage illustrant les cellules sanguines dans la région Blood cells diminue indiquant que les cellules ont été lysées. On remarque également le déplacement du nuage des objets vers la gauche (région des débris cellulaires), caractéristique de la diminution de la taille et de la complexité des cellules et donc de la lyse. Ce déplacement confirme qu'une lyse des cellules sous l'action de la saponine et de l'EDI se produit dans nos conditions expérimentales. La figure 3.31(iii) représente le pourcentage de

cellules sanguines survivantes dans la solution contrôle (99,9%) et la solution de lysat (0,02%) qui sont toutes deux présentées dans la figure 3.31(iv).

En comparant le résultat de la lyse à l'échelle macroscopique et microscopique, nous remarquons que la lyse microscopique est 5 fois plus efficace que la lyse macroscopique (le pourcentage de cellules sanguines survivantes après la lyse dans la puce est 0.02% au lieu de 0.1%).

3.7.3.1 La lyse du sang de cheval contenant des bactéries *E. Coli* marquées à l'échelle microscopique

Des tests fluidiques ont été effectués dans le module de lyse avec du sang contenant des bactéries marquées (10^5 UFC/mL). Les suspensions bactériennes ont été préparées, marquées selon les protocoles décrits dans la section 2.4 puis introduites dans le sang (suspension bactérienne : sang (1 : 9)). Les solutions finales récupérées à la sortie de la puce ont été analysées à l'aide de la cytométrie en flux. La figure 3.32 représente les deux matrices obtenues. La première matrice à gauche (figure 3.32(i)) représente les cellules sanguines avec les bactéries intactes avant leur passage dans la puce. La deuxième matrice (figure 3.32(ii)) représente la solution récupérée à la sortie de la puce. Pour les cellules sanguines, on remarque toujours le déplacement du nuage vers la région des débris, caractéristique de la lyse. Concernant les bactéries, nous avons suivi leur viabilité en suivant la fluorescence du fluorophore Syto 9 qui marque juste les bactéries viables.

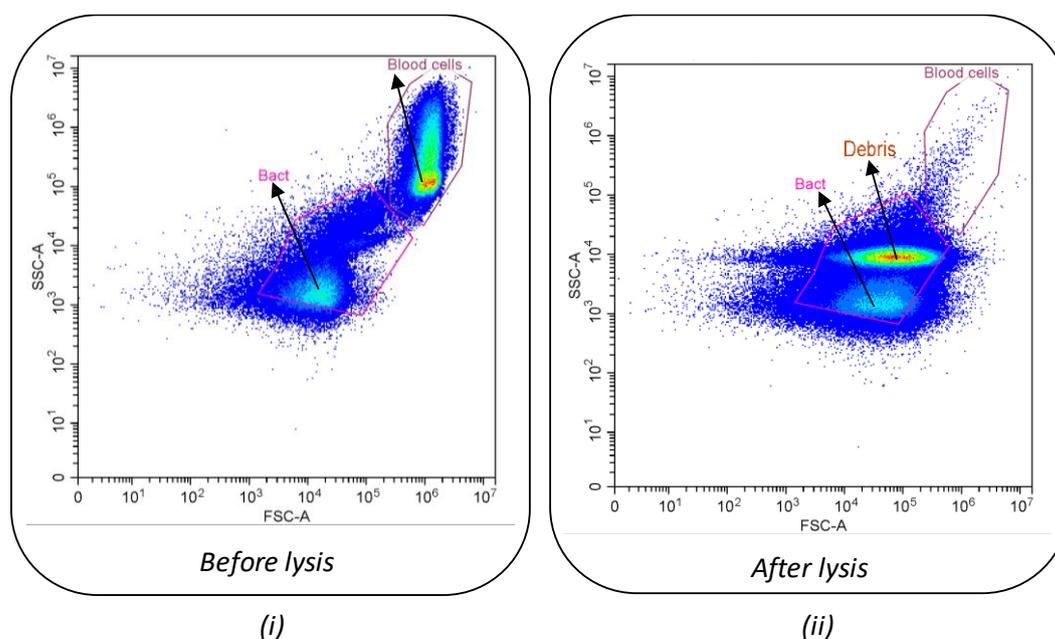


Figure 3. 32 Matrices obtenues pour (i) un échantillon de sang de cheval contenant de *E. Coli* avant la lyse et (ii) un échantillon de sang de cheval contenant de *E. Coli* additionné de saponine 1% et associé à un choc osmotique.

Comme le montre la figure 3.33 qui représente le pourcentage des bactéries viables avant et après leur passage dans la puce, nous observons que le pourcentage de bactéries viables dans l'échantillon récupéré en sortie du puce est quasi-identique à celui de la solution contrôle ($93,41 \pm 2\%$).

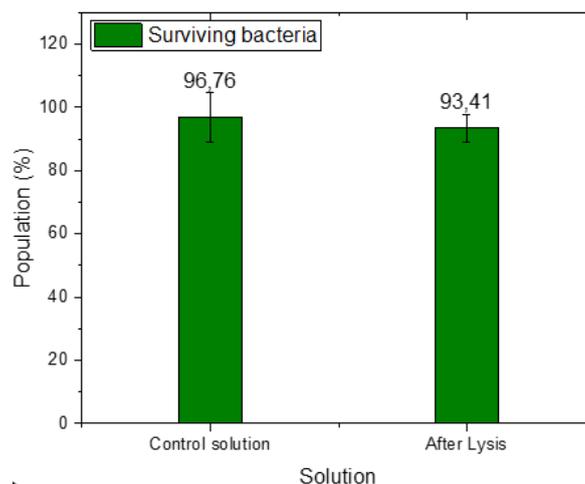


Figure 3. 33 Pourcentage des bactéries viables avant et après la lyse.

3.7.3.2 La lyse du sang humain contenant des bactéries *E. Coli* marquées à l'échelle microscopique

Des échantillons de sang provenant d'un donneur sain ont été prélevés à l'hôpital Universitaire Henri Mondor. Le sang a été enrichi en bactéries marquées (10^5 UFC/ml). Les mêmes tests ont été faits dans le module de lyse et les solutions finales récupérées à la sortie de la puce ont été analysées à l'aide de la cytométrie en flux.

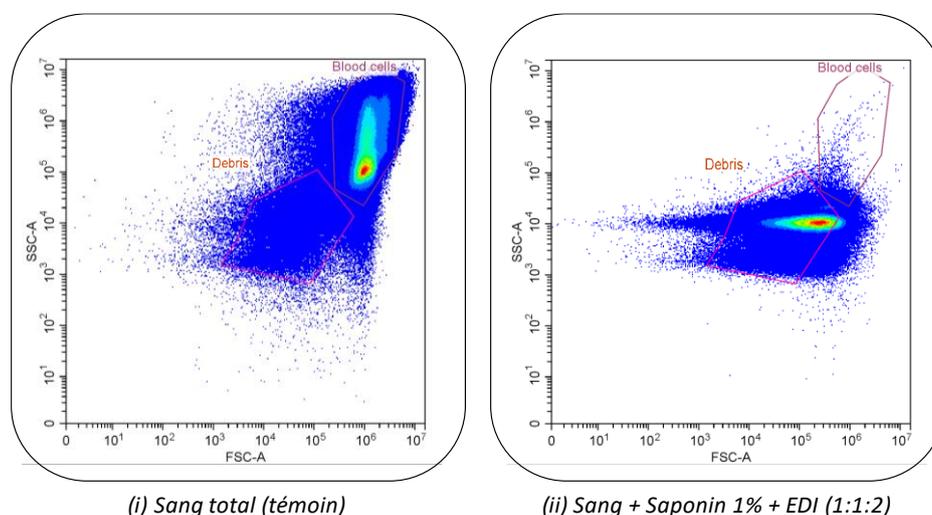


Figure 3. 34 Matrices obtenues pour (i) un échantillon de sang humain avant la lyse et (ii) un échantillon de sang humain additionné de saponine 1% et associé à un choc osmotique.

La figure 3.34 présente les matrices obtenues pour (i) un échantillon de sang total avant la lyse et (ii) un échantillon de sang additionné de saponine à 1 % et associé à un choc osmotique (Sang : Saponine : Eau 1 : 1 : 2).

La première matrice à gauche (figure 3.34(i)) représente la solution témoin, nous remarquons une grande population dans la région « Blood cells » avec beaucoup de bruits qui existent autour de cette région. Ceci correspond à la signature d'objets présents dans le sang total avant la lyse. Il est important de noter que toutes les expériences précédentes avaient été réalisées avec du sang de cheval défibriné. Cette signature obtenue pour du sang total humain est donc un peu différente. Lorsque les réactifs de la lyse sont ajoutés, les objets se déplacent vers la gauche et passent de la région « Blood Cells » à la région « Debris ». Cela indique qu'une partie des cellules ont été lysées (figure 3.34(ii)). Le traitement des données par le logiciel Cytoexpert montre qu'il reste 0,04 % des cellules sanguines dans la région « Blood cells » (figure 3.35). Ceci confirme bien que la lyse de sang humain total est possible grâce à notre puce microfluidique.

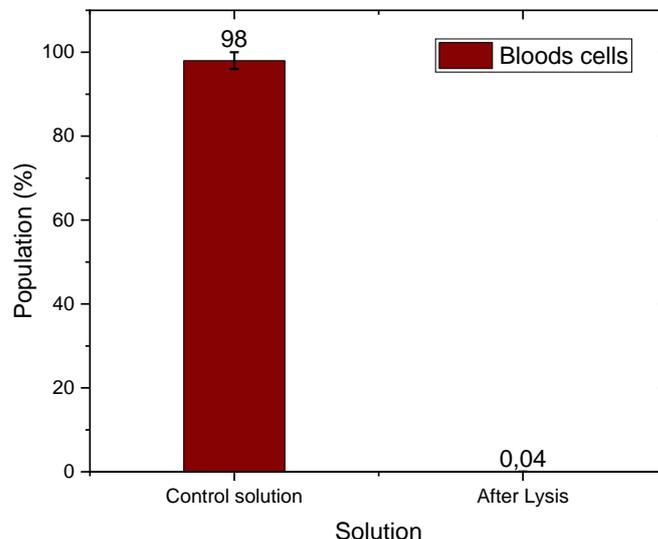


Figure 3. 35 Pourcentage des cellules sanguines avant et après la lyse.

Concernant les bactéries, la présence d'autres objets a rendu impossible l'observation d'une région où seules les bactéries sont observables. Cela est probablement dû à plusieurs raisons, dont notamment :

- 1) il y a peut-être eu un problème au cours du marquage des bactéries dans cette expérience, ou bien un problème dans la préparation de la suspension,

- 2) c'est peut-être relié à la concentration en bactéries dans la suspension qui n'a pas été vérifiée,
- 3) ou bien c'est peut-être relié aux souches bactériennes, qui ne sont pas similaires aux *E. coli* que nous utilisons habituellement.

En conclusion, nous avons réussi à optimiser un protocole de lyse sélective des cellules sanguines consistant à mélanger dans une puce microfluidique le sang avec une solution de saponine à 1 % m/v et de l'eau déionisée.

Lorsque les bactéries sont présentes à la concentration de 10^5 UFC/mL dans l'échantillon de sang de cheval, le protocole appliqué permet de récupérer à la sortie de la puce une solution de lysat contenant la totalité des bactéries viables. Tandis que, lorsque les bactéries sont introduites dans l'échantillon du sang humain, il n'est pas possible de tirer de conclusion sur leur viabilité, car nous n'avons pas réussi à les visualiser sur la matrice obtenue par cytométrie en flux. Ceci peut être lié à la concentration en bactéries dans la suspension, qui n'a pas été vérifiée dans cette expérience.

Les résultats obtenus avec le sang de cheval sont en cohérence avec les travaux de Zelenin [8]. Notre plateforme microfluidique a été optimisée pour fonctionner à un débit élevé d'environ $150 \mu\text{L}/\text{min}$, ce qui réduit le temps de traitement par un facteur 3 par rapport au dispositif de Zelenin ($48 \mu\text{L}/\text{min}$) [8].

Chapitre 4 – Performance du module de tri : méthodes et mesures

Après avoir effectué la lyse des cellules sanguines et avant d'extraire l'ADN génomique des bactéries, les bactéries récupérées doivent être triées du lysat sanguin où des débris peuvent encore exister.

Au vu de la bibliographie effectuée, nous avons choisi comme stratégie, de concevoir un dispositif permettant de séparer les bactéries des débris sanguins en utilisant la microfluidique inertielle.

1 Module de tri (Microparticules et bactéries)

1.1 Design

Le module de tri utilisé dans nos expériences est un simple canal en serpentin composé d'une entrée et de deux sorties : une sortie centrale (sortie #1) et une sortie latérale (sortie #2). Ce canal est constitué d'une section de 16,5 mm de long avec 16 coudes (figure 4.1). La longueur et la largeur de chaque coude U sont toutes deux égales à 700 μm . Dans ma thèse, nous avons testé deux hauteurs de canal différentes : 1) design 1 avec $h = 40 \mu\text{m}$ (similaire à celle de Zhang [66]) et 2) design 2 avec une hauteur réduite $h = 20 \mu\text{m}$.

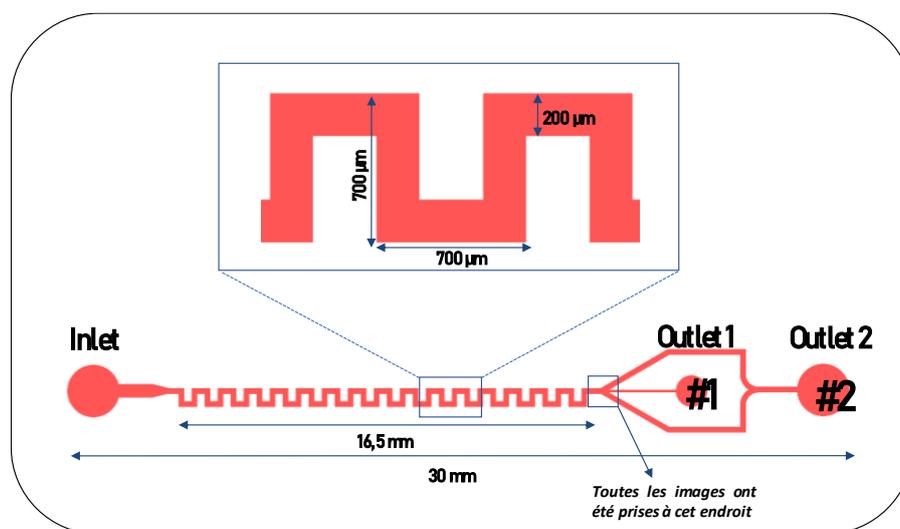


Figure 4. 1 Design L-Edit du module de tri

Des tests fluidiques avec des particules fluorescentes de 2, 5 et 15 μm ont été effectués à différents débits afin de démontrer le concept de tri. Les particules de 2 et de 5 μm fluorescent dans le vert, tandis que les particules de 15 μm fluorescent dans le rouge.

Pour chaque débit testé, une image fluorescente a été enregistrée à la sortie du canal au niveau du dernier coude et des sorties 1 et 2 (voir figure 4.1). Ces images permettent une comparaison directe des différentes positions d'équilibre pour chacun des flux. Nous avons également tracé les profils d'intensité de fluorescence des positions des particules à la sortie du canal au niveau du dernier coude.

Puisque ce dispositif a été développé en parallèle de celui de lyse du sang, j'ai commencé les expériences en utilisant des particules modèles. J'ai choisi des particules de 2 et de 5 μm pour mimer les bactéries que l'on cherche à isoler. Les grosses particules ($\sim 15 \mu\text{m}$) ont été choisies pour représenter les amas de débris sanguins. Mes premières expériences avec ce module de tri ont consisté à séparer les petites particules de 2 et de 5 μm des grosses particules de 15 μm .

Dans nos expériences, on cherche toujours à focaliser les petites particules de 2 et de 5 μm vers les parois du canal (sortie 2), tandis que les grosses particules seront dirigées vers le centre du canal (sortie 1).

1.2 Suspension de particules

Des particules de polystyrène fluorescentes de diamètre $a = 2 \mu\text{m}$ (produit n° G0200), 5 μm (produit n° G0500) et 15 μm (Product No. 36-4) ont été achetées chez Thermo Fisher Scientific et mélangées avec l'eau déionisée. Du Tween 20 (Sigma Aldrich, produit n°P9416) à 0,1% v/v a été ajouté pour empêcher l'agrégation des particules. Pour les applications de séparation, des concentrations de 0,02 % m/v ont été utilisées pour les particules de 2, 5 et 15 μm .

1.3 Banc expérimental

Le dispositif microfluidique a été placé sur un microscope inversé (Axio Observer Z1, Zeiss), éclairé par une lampe à fluorescences (HXP). L'étape initiale consiste à positionner la puce pour l'observer au microscope. Les connexions fluidiques sont positionnées et les solutions sont injectées à l'aide d'un pousse-seringue (Nemesys, CETONI, Germany). Les fuites sont vérifiées pendant la première étape de rinçage avec du NaCl 0,9% m/v pendant 5 min. Les images de fluorescence ont été observées et capturées par une caméra CMOS (Orca Flash 4.0 LT), puis analysées à l'aide du logiciel Image live. Le banc expérimental est décrit dans la figure 4.2.

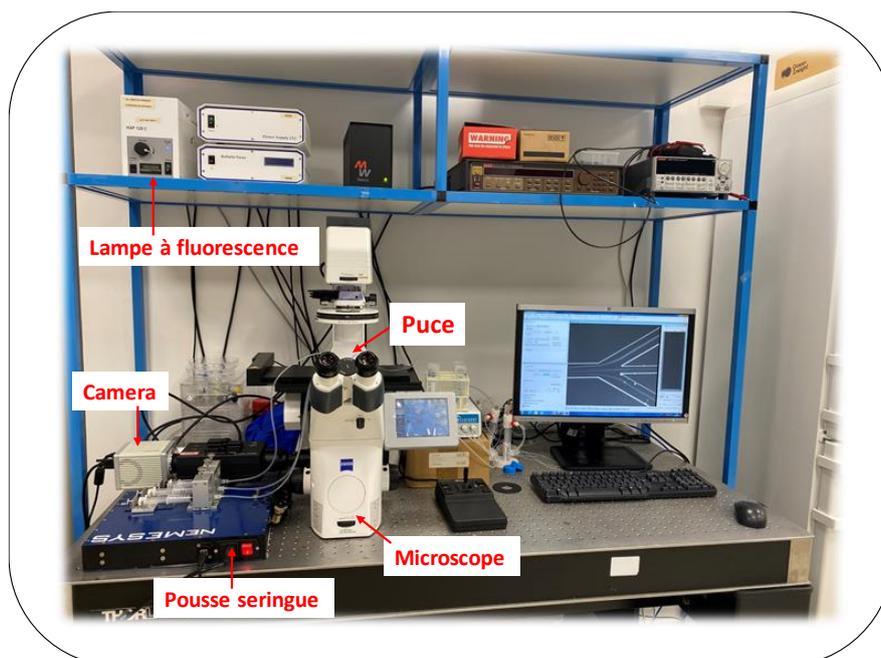


Figure 4. 2 Banc expérimental

Comme nous travaillons avec des particules/cellules fluorescentes (rouge et verte), nous utilisons un filtre de microscope « 09 » (Zeiss) adapté à ces deux couleurs. Le jeu de filtres « 09 » présente une bande d'excitation comprise entre 465 et 505 nm et une bande d'émission à partir de 515 nm.

1.4 Résultats et discussions

1.4.1 Tests fluidiques, design 1 ($h=40\ \mu\text{m}$)

1.4.1.1 Tri des particules de $2\ \mu\text{m}$

Des particules de polystyrène fluorescentes d'un diamètre moyen de $2\ \mu\text{m}$ diluées dans l'eau déionisée avec du Tween 20 ont été injectées tout d'abord dans le design 1 du dispositif de tri présentant une grande hauteur de canal ($h=40\ \mu\text{m}$) comme dans les expériences de Zhang [66]. Nous avons effectué plusieurs expériences avec un débit appliqué variant de 200 à 600 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A l'entrée de la puce, les particules sont distribuées de manière aléatoire. Après plusieurs périodes de serpentin, les particules de $2\ \mu\text{m}$ focalisent sur les parois du canal (voir figure 4.3, sortie). Nous devons souligner ici que la focalisation des particules vers les parois d'un canal microfluidique est produite par la force nette de portance inertielle, décrites dans le chapitre 1 (équation 18). L'équilibre entre la force de portance de la paroi, qui repousse les particules vers la ligne centrale du canal, et la force de portance du gradient de cisaillement, qui dirige les particules vers les parois du canal, crée deux positions d'équilibre à mi-chemin entre les parois et la ligne centrale du canal. Cette théorie peut raisonnablement expliquer les résultats obtenus par Segre et Silberberg [41], qui ont observé que des particules initialement dispersées de façon aléatoire dans un tube cylindrique se concentraient, à une distance donnée de l'entrée du canal, sur un anneau dont le rayon était d'environ 0,6 fois le rayon du tube.

D'après la figure 4.3(i), nous remarquons que, quel que soit le débit appliqué, il reste toujours des particules qui passent dans le canal central à la sortie du dispositif, cela signifie qu'elles n'ont pas subi une force de portance inertielle suffisante dans le processus de migration. Un autre paramètre pertinent est le rapport de force inertielle (R_f), introduit dans l'équation (27) (page 44 du chapitre 2). La figure 4.3(ii) présente l'évolution du rapport R_f en fonction du diamètre a de la particule. Di Carlo [43] a rapporté des valeurs de R_f supérieure à 0,04 pour observer la focalisation inertielle des particules. Dans notre cas, la valeur de R_f pour les particules de $2\ \mu\text{m}$ est 0,02 soit inférieure à 0,04. Cette valeur qui explique pourquoi elles ne se focalisent pas totalement à l'extrémité du canal. L'analyse en pourcentage des particules

collectées aux deux sorties 1 et 2 est finalement donnée sur la figure 4.3 (iii) qui montre que 37 % des particules sont collectées dans la sortie 1 et 63 % dans la sortie 2.

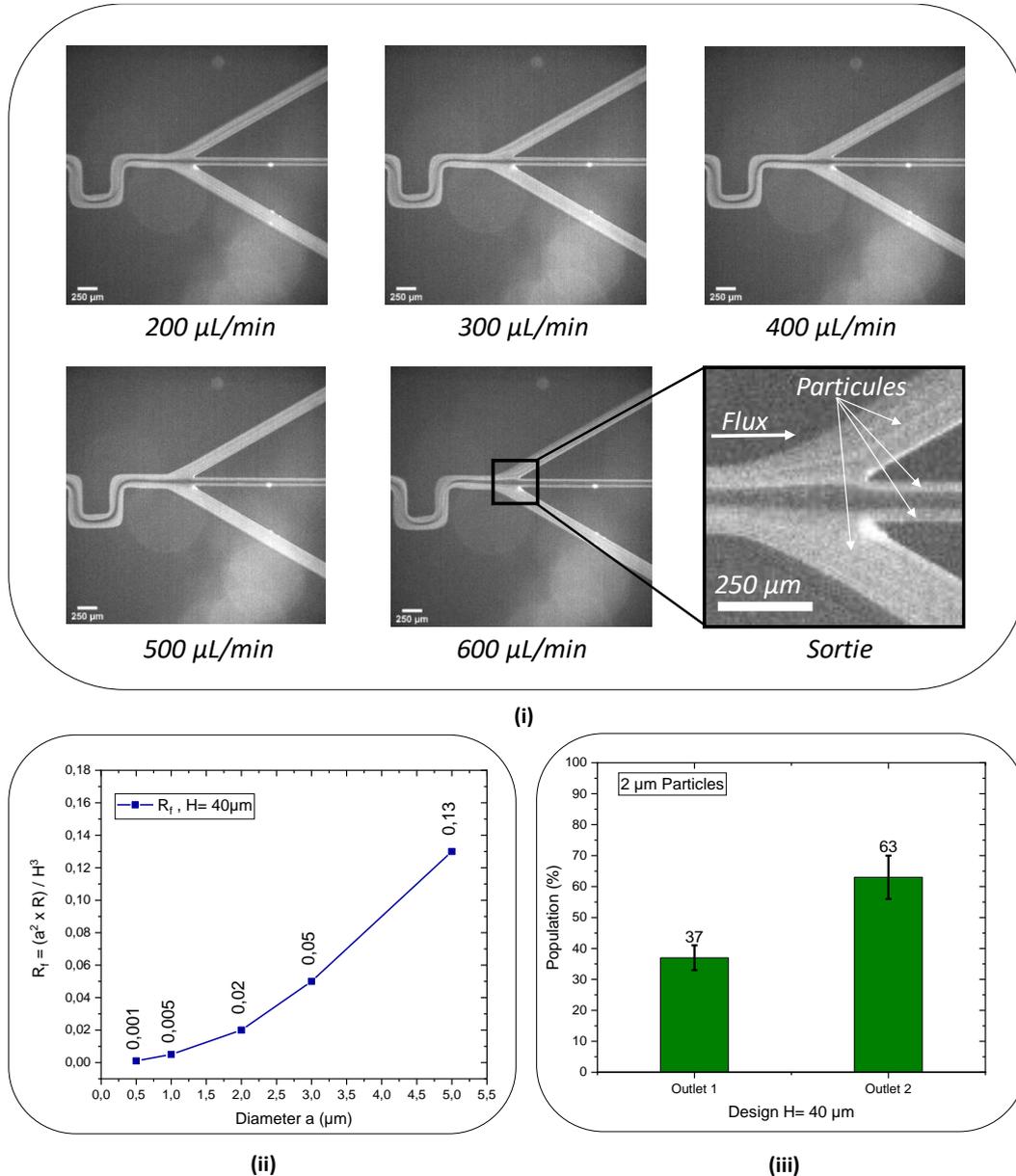


Figure 4. 3 Focalisation de particules de 2 µm pour différents débits à la sortie du module de tri (i). Rapport R_f en fonction du diamètre des particules (ii). Pourcentage des particules collectées aux deux sorties 1 et 2 du canal (iii).

D'après l'équation (18), la force de portance nette (F_L) dépend très fortement du diamètre des particules, jusqu'au quatrième ordre. Cela traduit que, quelle que soit la vitesse d'écoulement, les particules de 2 µm, se concentreront dans une moindre mesure ou même ne se concentreront pas du tout. Afin d'augmenter l'efficacité de la force inertielle F_L , nous avons réalisé des expériences sur ce dispositif en utilisant des particules de taille supérieure à 2 µm (5 µm).

1.4.1.2 Tri des particules de 5 μm

Une suspension de particules fluorescentes de 5 μm a été injectée dans le canal en serpentin, et différents débits allant de 100 à 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ ont été testés. La valeur de R_f calculée pour les particules de 5 μm est de 0,13 (voir figure 4.3(ii)). Cette valeur, qui est bien supérieure à 0,04 (~ 3.3 fois), est en accord avec la focalisation totale observée à la sortie du canal.

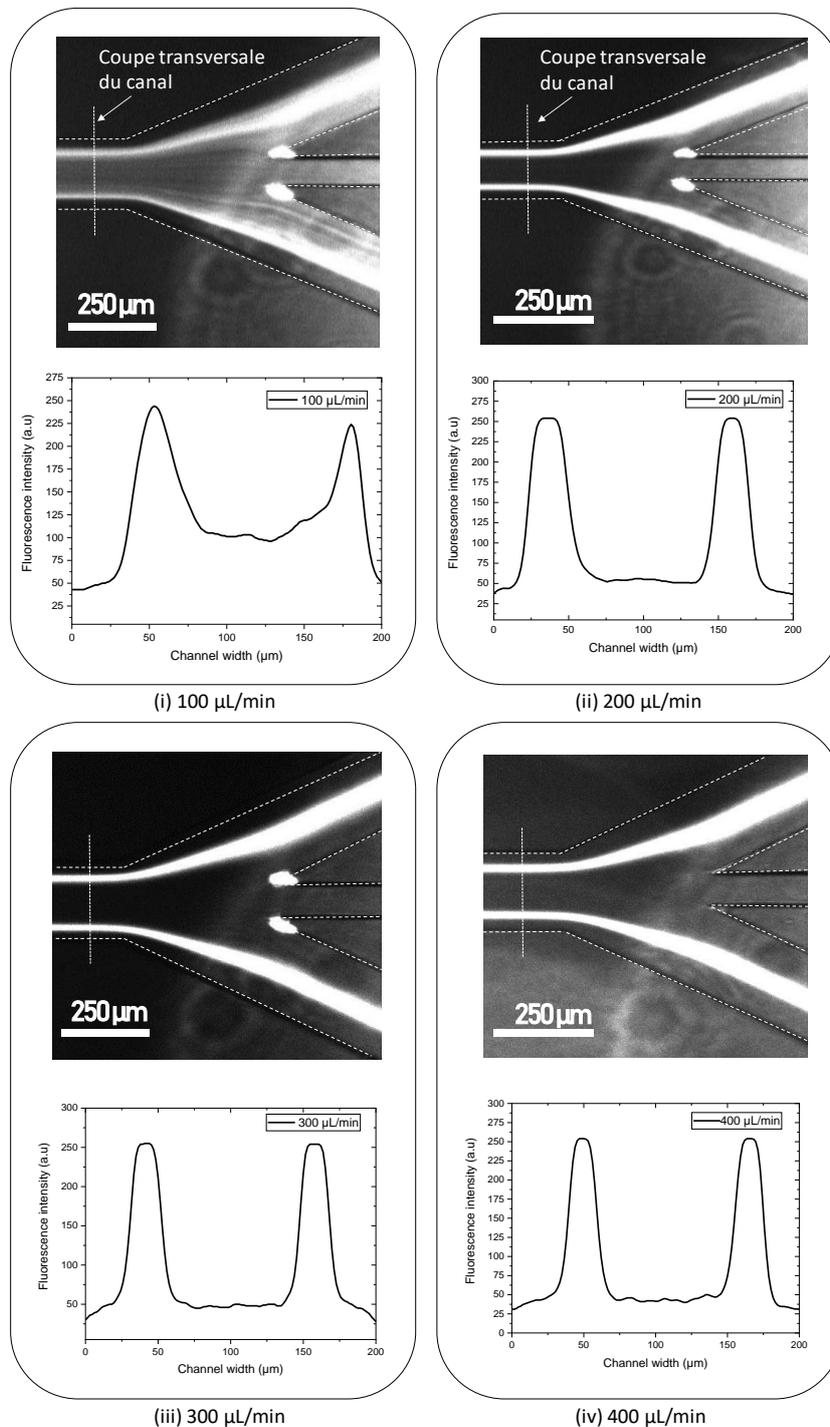


Figure 4. 4 Images des positions latérales et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (i), 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (ii) 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ (iii) et de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ (iv).

Les images avec leurs profils d'intensité de fluorescence mesurés en coupe transversale du canal à la sortie de la puce pour chaque débit (figures 4.4 et 4.5), montrent que la focalisation inertielle des particules de $5\ \mu\text{m}$ se produit à partir de $200\ \mu\text{L}/\text{min}$ (figure 4.4 (ii)). Au-dessous de cette valeur, les pics du profil des positions latérales ne sont pas bien séparés (figure 4.4(i)), ce qui traduit une focalisation partielle des particules.

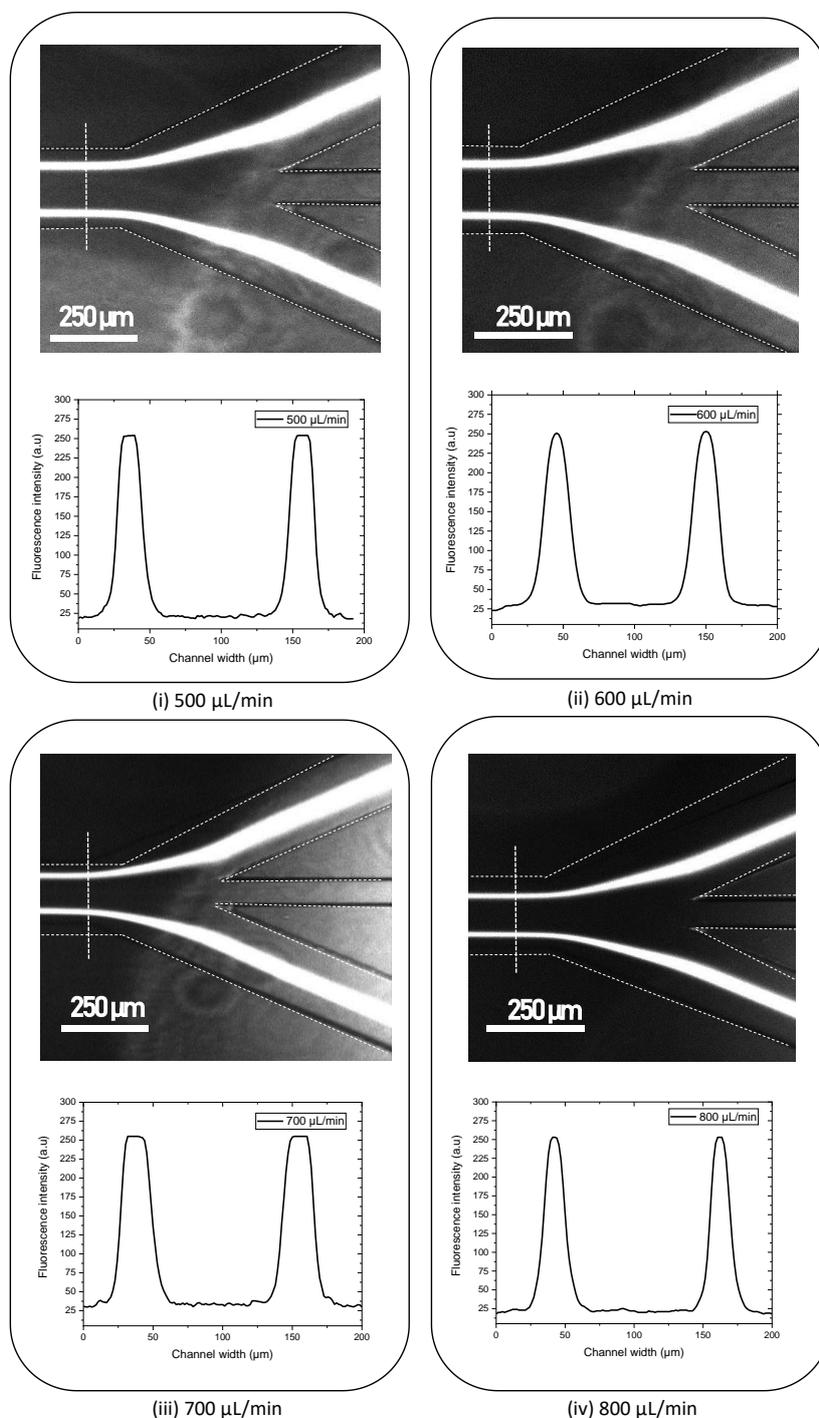


Figure 4. 5 Images des positions latérales des particules de $5\ \mu\text{m}$ et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de $500\ \mu\text{L}/\text{min}$ (i), $600\ \mu\text{L}/\text{min}$ (ii) $700\ \mu\text{L}/\text{min}$ (iii) et de $800\ \mu\text{L}/\text{min}$ (iv).

Après avoir réussi à trier des particules de 5 μm à la sortie du canal, des tests fluidiques ont été effectués avec des mélanges de particules de tailles différentes (5 et 15 μm) afin de déterminer les conditions optimales de leur séparation.

1.4.1.3 Tri des particules de différentes tailles (5 et 15 μm)

Un mélange de particules fluorescentes de diamètre de 5 μm et 15 μm a été introduit dans le dispositif de tri à différents débits allant de 100 jusqu'à 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figures 4.6 et 4.7). Le but de cette expérience est de concentrer les petites particules à l'extrémité du canal (vers les parois) et les grosses particules au centre du canal.

Comme le montre la figure 4.6, pour un faible débit (100 $\mu\text{L}/\text{min}$), les particules subissent une focalisation partielle à la sortie du canal (figure 4.6(i)). Au-delà de ce débit (entre 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 400 $\mu\text{L}/\text{min}$), les deux types des particules migrent vers des positions d'équilibre situées sur les parois latérales du canal (figure 4.6(ii-iii-iv)). À ces débits, les deux types des particules sont dominés par la force de portance inertielle.

La focalisation des grosses particules au centre du canal débute à partir de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 4.7 (i)). La fluorescence est détectée au centre du canal, ce qui traduit le début de focalisation des grosses particules. Pour 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ nous atteignons une focalisation optimale : les 3 pics de fluorescence sont bien séparés (figure 4.7(ii)). Le pic central correspond aux grosses particules de 15 μm , tandis que les deux pics latéraux correspondent aux petites particules de 5 μm . Au-delà d'un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, la focalisation se détériore (figure 4.7 iii) et disparaît complètement à 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figure 4.7(iv)).

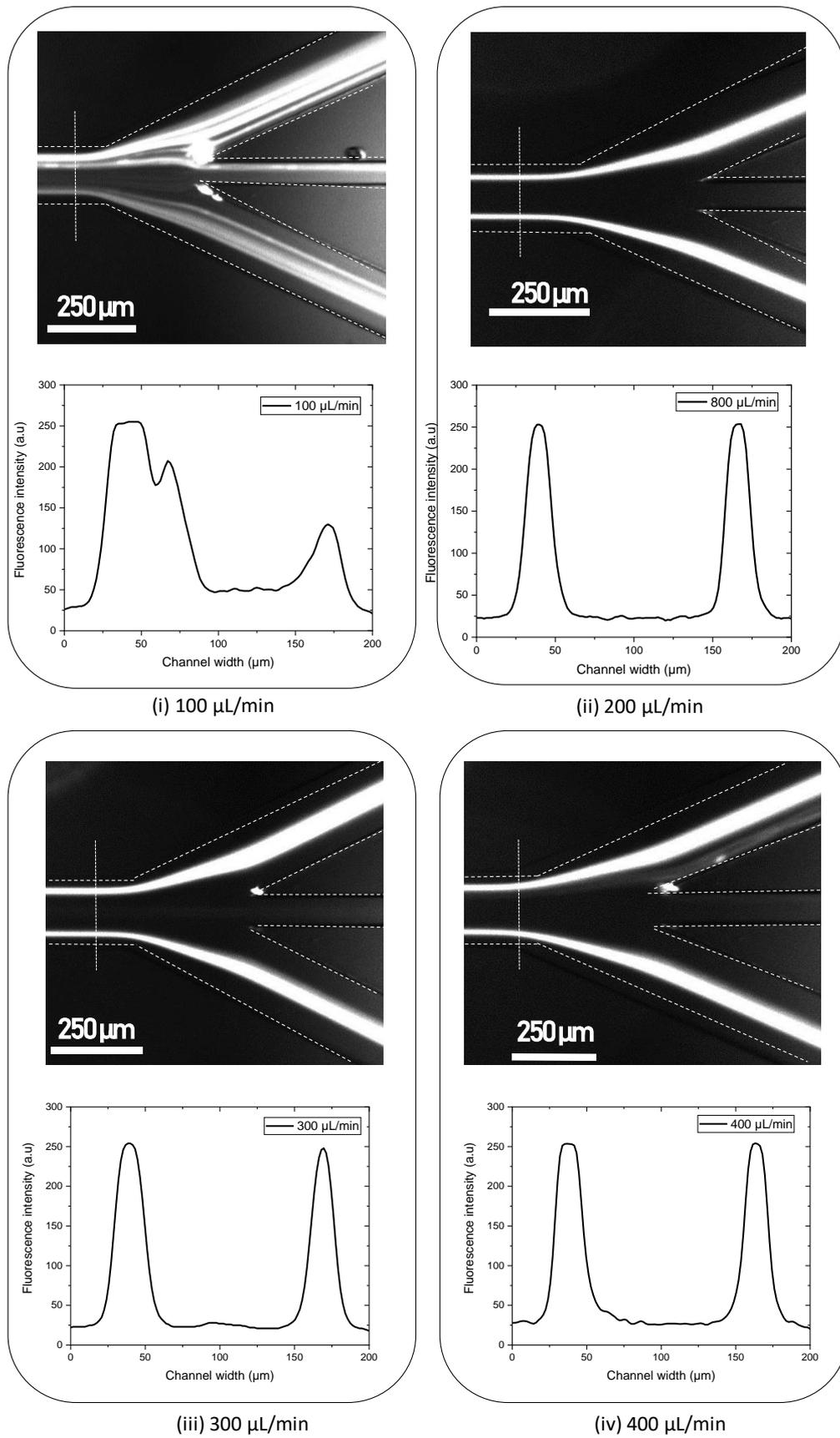


Figure 4. 6 Images des positions latérales et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (i), 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (ii) 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ (iii) et de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ (iv).

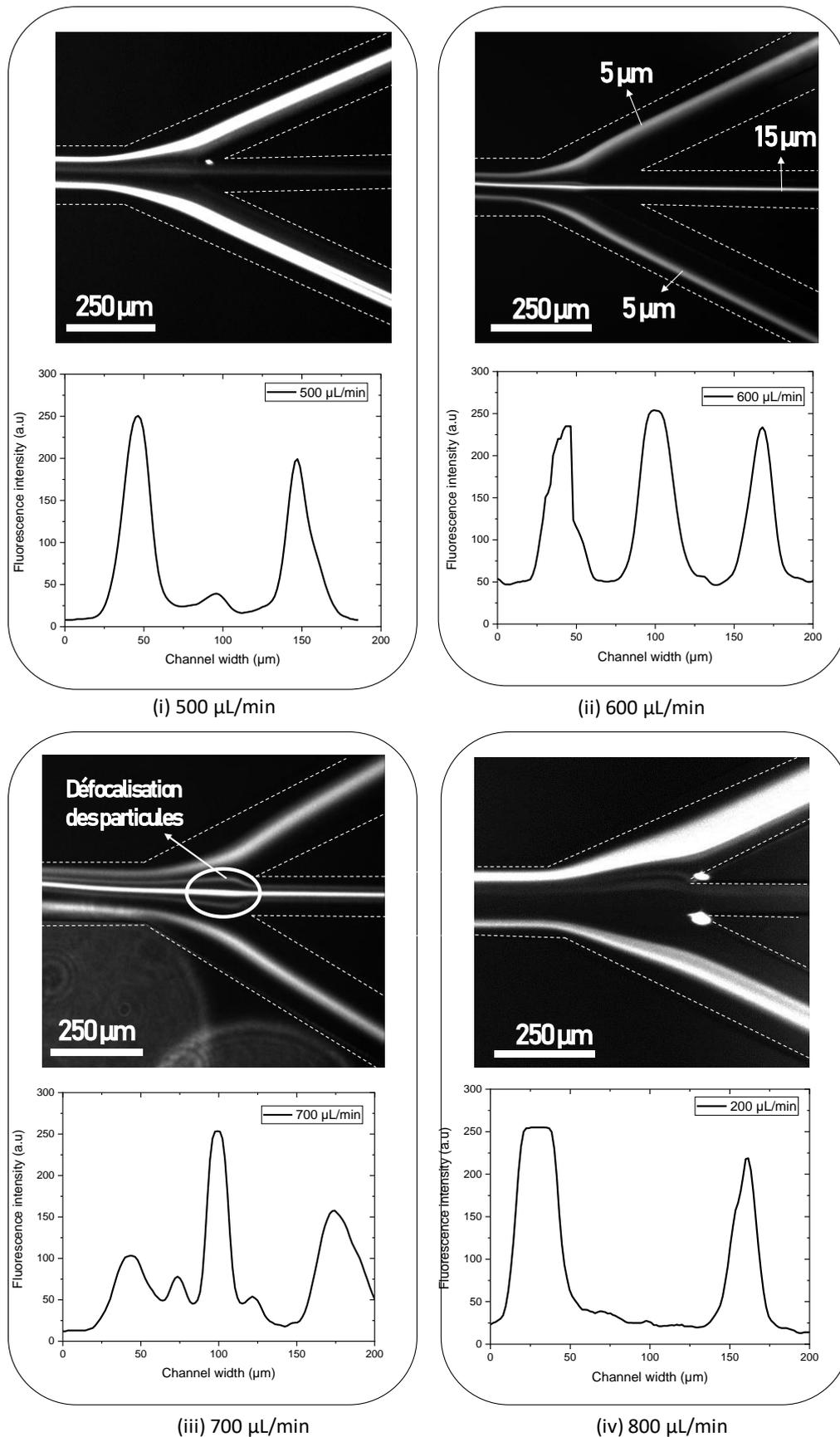
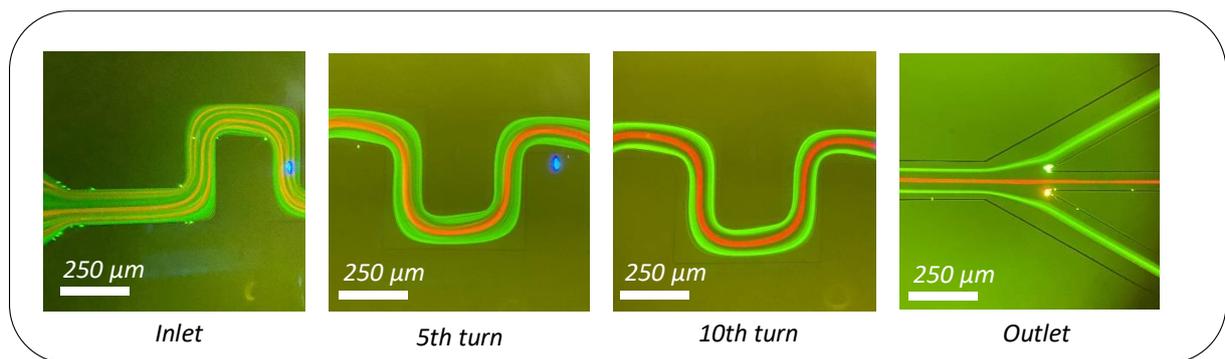


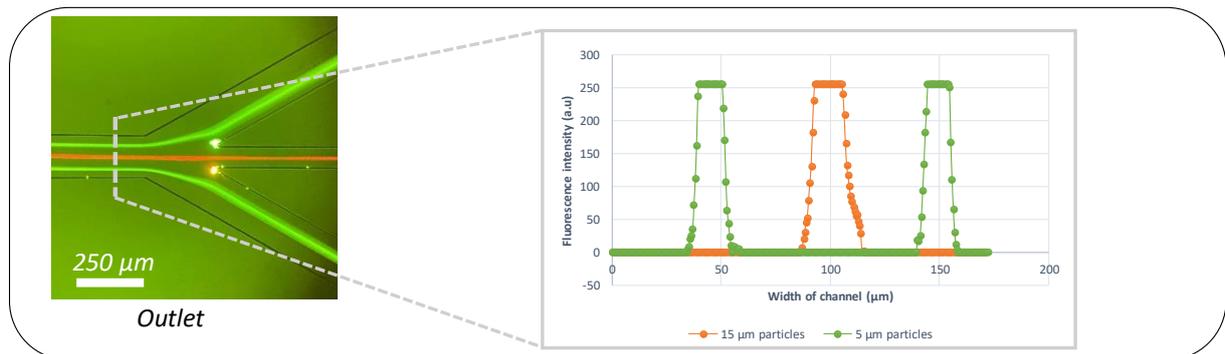
Figure 4. 7 Images des positions latérales des particules de 5 et de 15 μm et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (i), 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ (ii) et de 700 $\mu\text{L}/\text{min}$ (iii).

La figure 4.8(i) présente les images enregistrées au débit optimal (600 $\mu\text{L}/\text{min}$). Ces images ont été prises à 4 endroits différents du canal (à l'entrée, au 5^e coude, au 10^e coude et à la sortie).

A l'entrée de la puce, les particules sont distribuées de manière aléatoire. Après plusieurs périodes de serpentin, les particules de 15 μm migrent vers le centre du canal (dominé par les forces de Dean et centrifuges) et celles de 5 μm entraînées par la force nette de portance inertielle, occupent les côtés latéraux du canal.



(i)



(ii)

Figure 4. 8 (i) Images fluorescentes de particules à différents endroits du canal en serpentin au débit optimal.
(ii) Profil d'intensité de fluorescence en coupe transversale du canal à la sortie de la puce.

La figure 4.8 (ii) présente le profil d'intensité de fluorescence qui montre clairement les positions latérales distinctes des particules de 15 μm et de 5 μm . Le pic central correspond aux grosses particules rouges, tandis que les deux pics latéraux correspondent aux petites particules vertes.

Ceci est en cohérence avec les travaux de Zhang *et al.* [67] mentionnant que les positions d'équilibres des particules de diamètre supérieurs à 8 μm passent de deux à une seule position d'équilibres au centre du canal (voir figure 4.9).

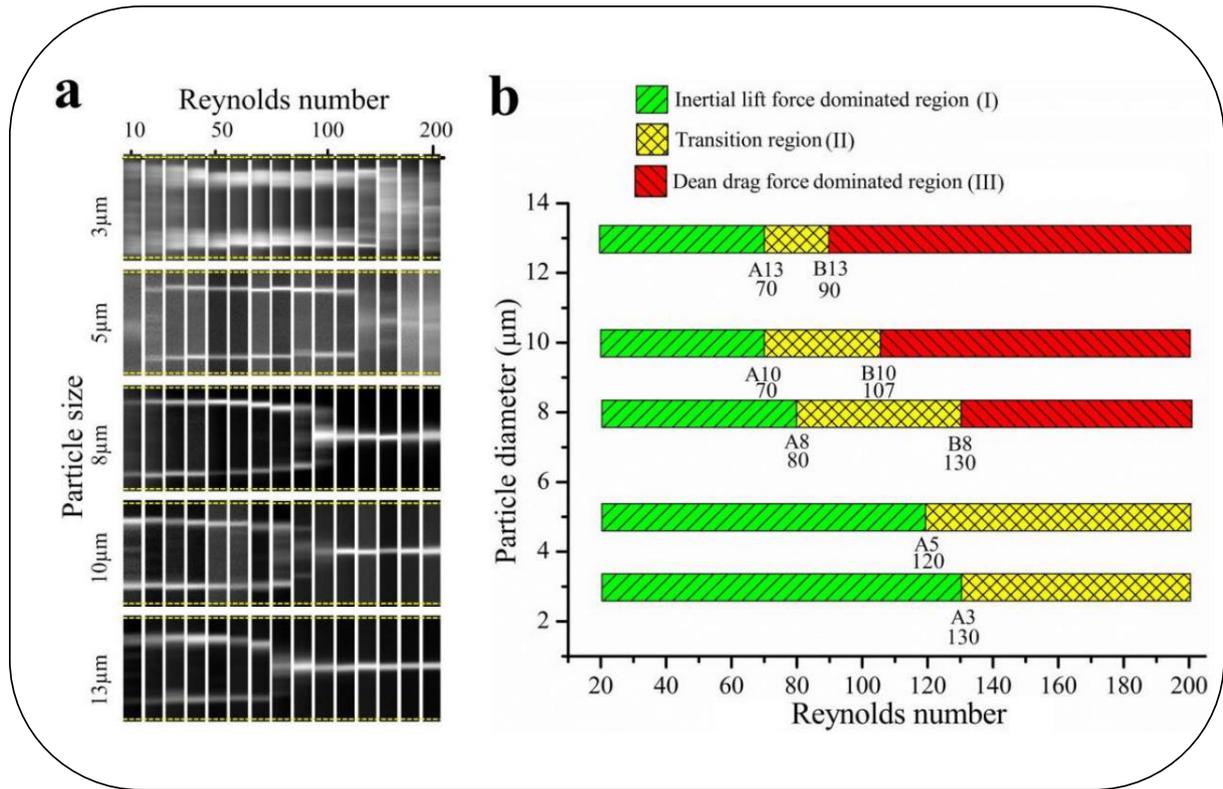


Figure 4. 9 (a) Images prises à la sortie du canal pour des particules de différentes tailles dans diverses conditions d'écoulement ; (b) Traduction du modèle de focalisation des particules en trois régions standard dans l'espace nombre de Reynolds - diamètre des particules [67].

Cette modification est produite par la force F_{DC} tel que $F_{DC} = F_{cent} + F_{SF}$. Ces deux forces sont orientées dans la même direction, du coin intérieur au coin extérieur. Ainsi, le mouvement de la particule dans chaque virage est en fait un mouvement centrifuge. De plus, les coins intérieur et extérieur changent après chaque virage, l'effet de ce changement est que les particules sont déviées vers le centre du canal après chaque période, et le résultat final sera une traînée focalisée au centre du canal à la sortie (voir figure 4.10) [66].

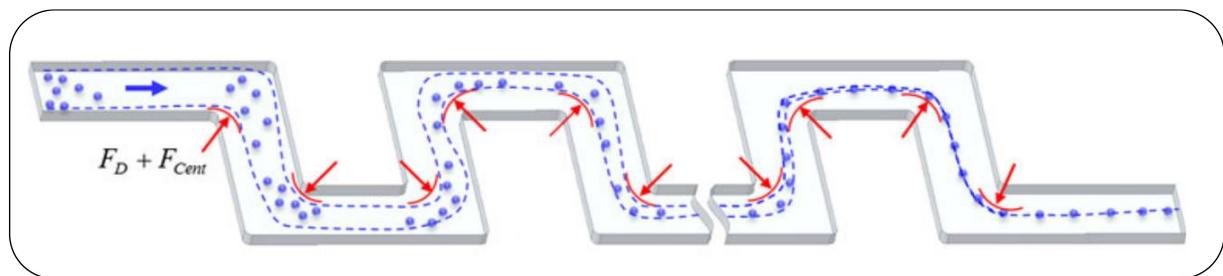


Figure 4. 10 Schéma représentant l'action de la force centrifuge et la force de Dean sur les particules en suspension dans un fluide [66].

La figure 4.11 (i) présente les diagrammes obtenus par cytométrie en flux de l'échantillon prélevé à l'entrée, à la sortie centrale #1 et à la sortie #2 des deux canaux latéraux. La solution analysée à l'entrée de la puce présente deux populations différentes : la première appartient

aux petites particules, tandis que la deuxième appartient aux grosses particules. La solution collectée en sortie 1 présente une seule population contenant les grosses particules, tandis que la solution collectée en sortie 2 présente une seule population avec les petites particules. Ces mesures indiquent une bonne séparation des deux types de particules.

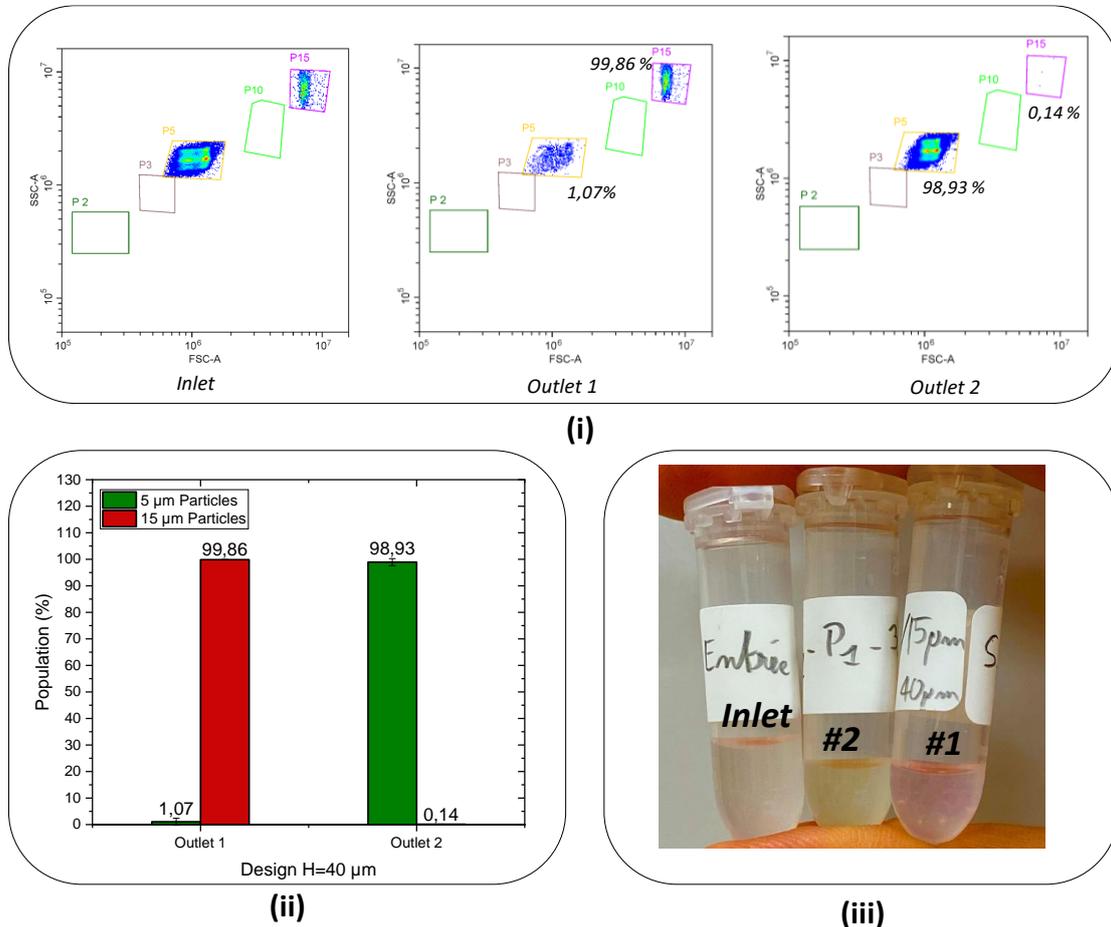


Figure 4. 11. Données de cytométrie en flux des solutions collectées à l'entrée et aux sorties #1 et #2 (i). Pourcentage de particules collectées aux deux sorties 1 et 2 (ii). Images de la suspension de particules avant et après le tri (iii).

L'analyse en pourcentage des particules collectées aux deux sorties 1 et 2 est donnée sur la figure 4.11(ii). On observe une très haute pureté de 99,86 % des grosses particules de 15 μm dans la sortie 1 et aussi une haute pureté de 98,93 % des petites particules de 5 μm dans la sortie 2. Une image des 3 suspensions de particules avant et après le tri est présentée dans la figure 4.11(iii). La couleur de la suspension collectée en sortie 1 est rouge ce qui confirme bien qu'elle contient les particules de 15 μm, tandis que, la couleur de la suspension collectée en sortie 2 est verte/jaune ce qui indique qu'elle contient les particules de 5 μm. La solution injectée à l'entrée de la puce contient les deux types des particules. Nous pouvons tout de suite observer à l'œil nu la différence de couleurs entre ces trois suspensions, ce qui confirme la

séparation efficace des particules dans le canal serpentin mesurée précédemment par cytométrie en flux.

1.4.1.4 Tri des bactéries *E. Coli*

Les paramètres de tri ayant été optimisés avec des particules modèles, nous avons reproduit les mêmes expériences avec des bactéries introduites dans l'eau peptonée.

Les bactéries utilisées dans ma thèse sont de type *E. Coli*, de taille voisine de 0,5 à 2 μm . Ces tests vont donc nous permettre de voir comment les bactéries vont se focaliser, par comparaison aux particules fluorescentes de l'expérience précédente.

Des bactéries contenues dans l'eau peptonée à 10^6 UFC/mL ont été injectées dans la puce de tri à différents débits : 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ (voir Annexe 6, figure A.4). Des photos associées à leur profil d'intensité de fluorescence ont été prises uniquement à la sortie du module de tri au niveau du dernier coude et des sorties 1 et 2 afin d'observer la focalisation en fin de puce.

Pour un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous pouvons tout de suite observer que la focalisation n'a pas lieu (figure 4.12(i)). A partir de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous obtenons pour chaque débit une légère focalisation des bactéries sur les parois latérales du canal, mais, c'est pour un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, que l'observation est la plus remarquable (figure 4.12(ii-iii)).

Pour ce débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous remarquons une légère migration des bactéries du centre vers les parois du canal (voir figure 4.13 (i)). Ici, les forces de portance ne sont pas aussi importantes pour permettre une vraie focalisation des bactéries aux positions d'équilibres attendues. On peut rapidement vérifier cela en calculant le rapport d'inertiel R_f qui est compris ici entre 0,005 et 0,02, ne respectant donc pas les conditions établies par Di Carlo quant à la focalisation des particules ($R_f > 0,04$).

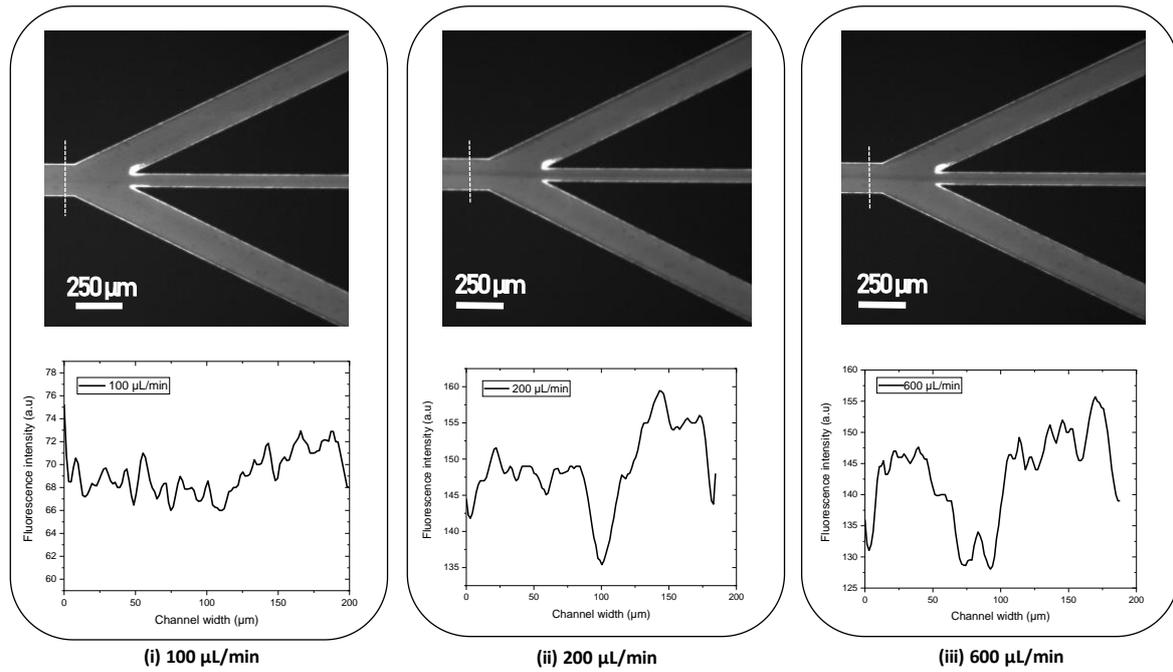


Figure 4. 12 Images des positions latérales des *E. Coli* et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de 100 µL/min (i), 200 µL/min (ii) et de 600 µL/min (iii).

L'analyse en pourcentage des bactéries collectées aux deux sorties 1 et 2, donnée sur la figure 4.13(ii), montre une pureté de 41 % pour la solution collectée dans la sortie 1 et de 59 % pour celle collectée dans la sortie 2.

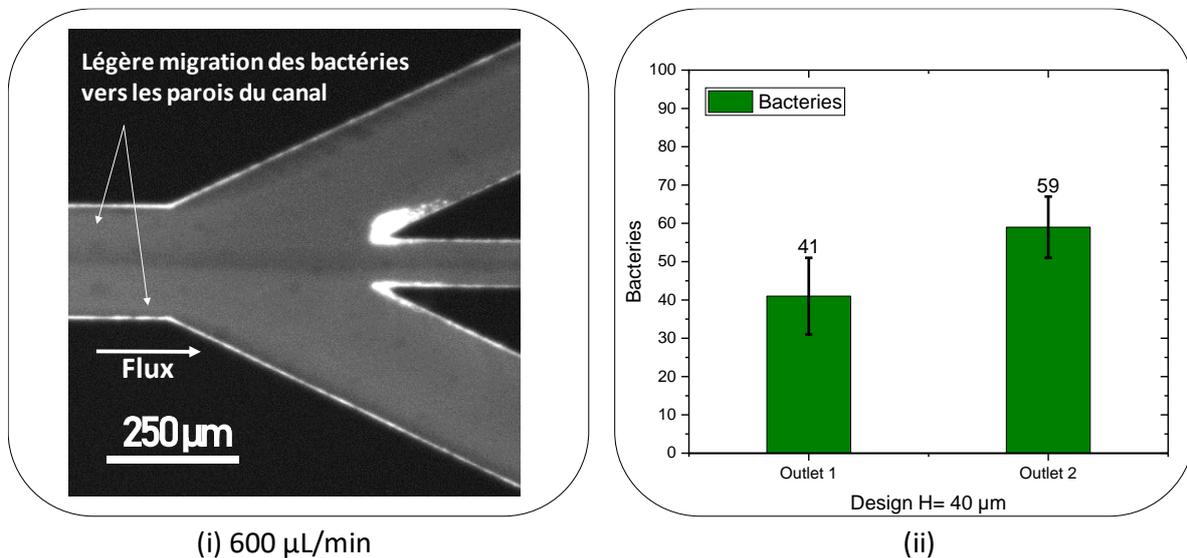


Figure 4. 13 (i) Image prise à la sortie du canal (ii) Pourcentage des bactéries collectées aux deux sorties 1 et 2 du canal.

Sur la base de ces résultats, nous avons pensé à diminuer la hauteur du canal H afin d'augmenter le rapport R_f .

Nous avons fabriqué des dispositifs de tri avec une hauteur de 20 μm et nous avons recommencé les mêmes expériences.

1.4.2 Tests fluidique, design 2 ($h=20 \mu\text{m}$)

1.4.2.1 Tri des particules de 2 μm

Des tests fluidiques avec des particules de 2 μm ont été effectués pour différents débits allant de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ jusqu'à 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ (voir Annexe 6, figure A.5). La nouvelle valeur de R_f calculée pour les particules de 2 μm est de 0,17 (voir figure 4.14(iv)). Cette valeur, qui est bien supérieure à 0,04 (~ 4.3 fois), est en accord avec la focalisation inertielle à la sortie du canal.

Pour des débits supérieurs à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, les résultats sont quasi-similaires, nous avons réussi à récupérer 87,7% des particules dans les canaux latéraux (figure 4.14(v)).

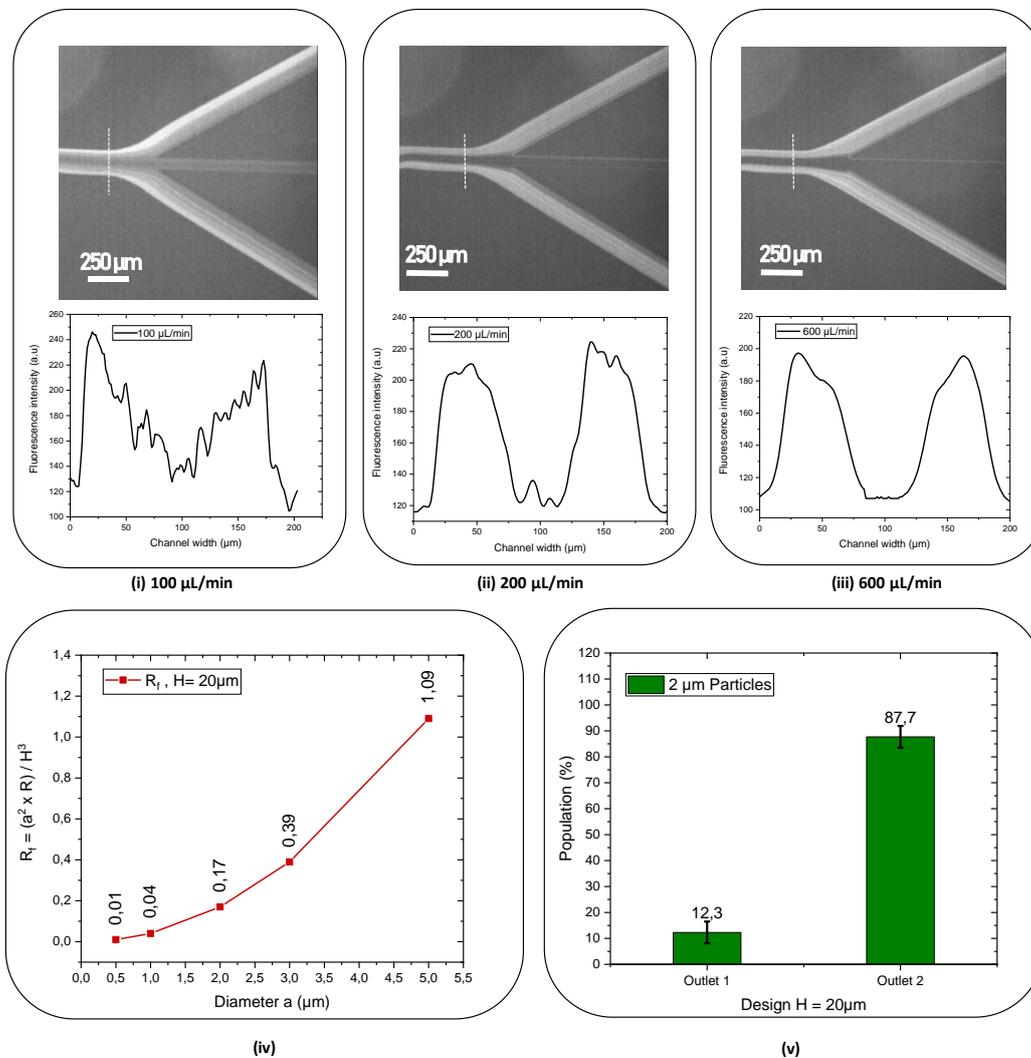


Figure 4. 14 Images des positions latérales des particules de 2 μm et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (i), 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (ii) et de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ (iii). Rapport R_f en fonction du diamètre des particules (iv). Pourcentages des particules collectées aux deux sorties 1 et 2 du canal (v).

En diminuant la hauteur du canal de $40\ \mu\text{m}$ à $20\ \mu\text{m}$, nous avons gagné 26% en plus de pureté pour les particules collectées en sortie 2, soit 87,7% au lieu de 63% avec le dispositif de hauteur de canal $40\ \mu\text{m}$ (voir figure 4.15).

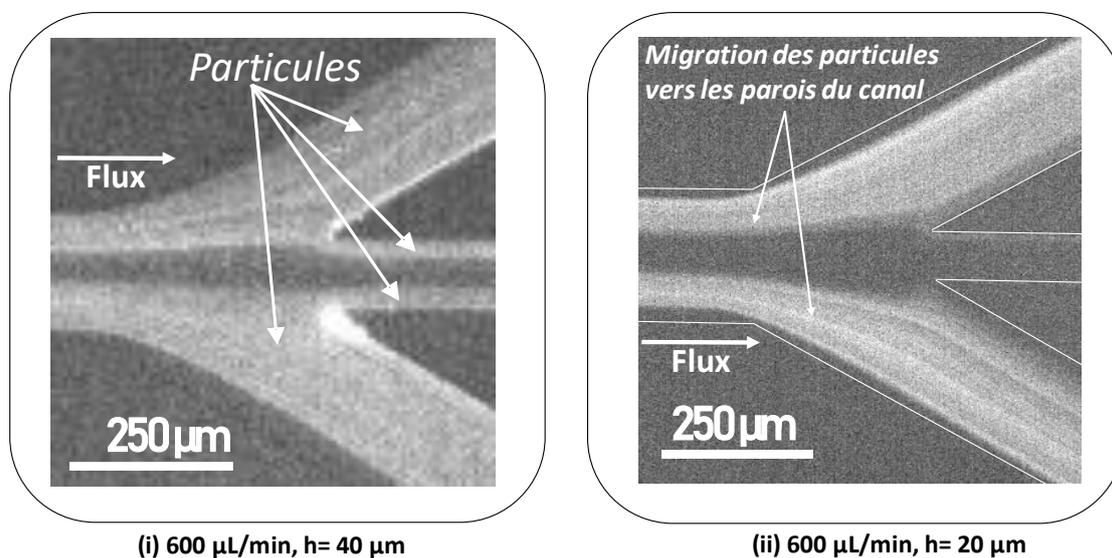


Figure 4. 15 Images des positions latérales des particules de $2\ \mu\text{m}$ à la sortie du canal pour un débit de $600\ \mu\text{L}/\text{min}$ à différentes hauteurs du canal (i) $h=40\ \mu\text{m}$ et (ii) $h=20\ \mu\text{m}$.

1.4.2.2 Tri des bactéries (*E. Coli*)

Nous avons reproduit les expériences faites précédemment sur un dispositif présentant des canaux de grande hauteur ($h=40\ \mu\text{m}$) avec des puces de tri présentant des canaux de faible hauteur ($h=20\ \mu\text{m}$) correspondant au design 2 (voir Annexe 6, figure. A6). Nous avons constaté que les résultats sont quasiment similaires à ceux obtenus avec le Design 1, c'est-à-dire une absence de focalisation.

Le meilleur résultat est toujours observé avec un débit de $600\ \mu\text{L}/\text{min}$ (4.16(iii)). Malheureusement même à ce débit élevé, les bactéries ne sont pas complètement dirigées vers les parois du canal (voir figure 4.17 (i)). Cet effet de focalisation partielle peut être dû au fait que le rapport R_f d'*E. Coli* varie toujours entre 0,01 et 0,17 (figure 4.14(iv)). Il aurait fallu sans doute réduire encore la hauteur du canal à $10\ \mu\text{m}$ par exemple pour obtenir un tri sélectif parfait. Toutefois, nous verrons dans le chapitre suivant qu'une grande différence de hauteur de canal entre le module de lyse et celui de tri est quasiment impossible à gérer en terme de résistance fluidique et donc de différence de pression.

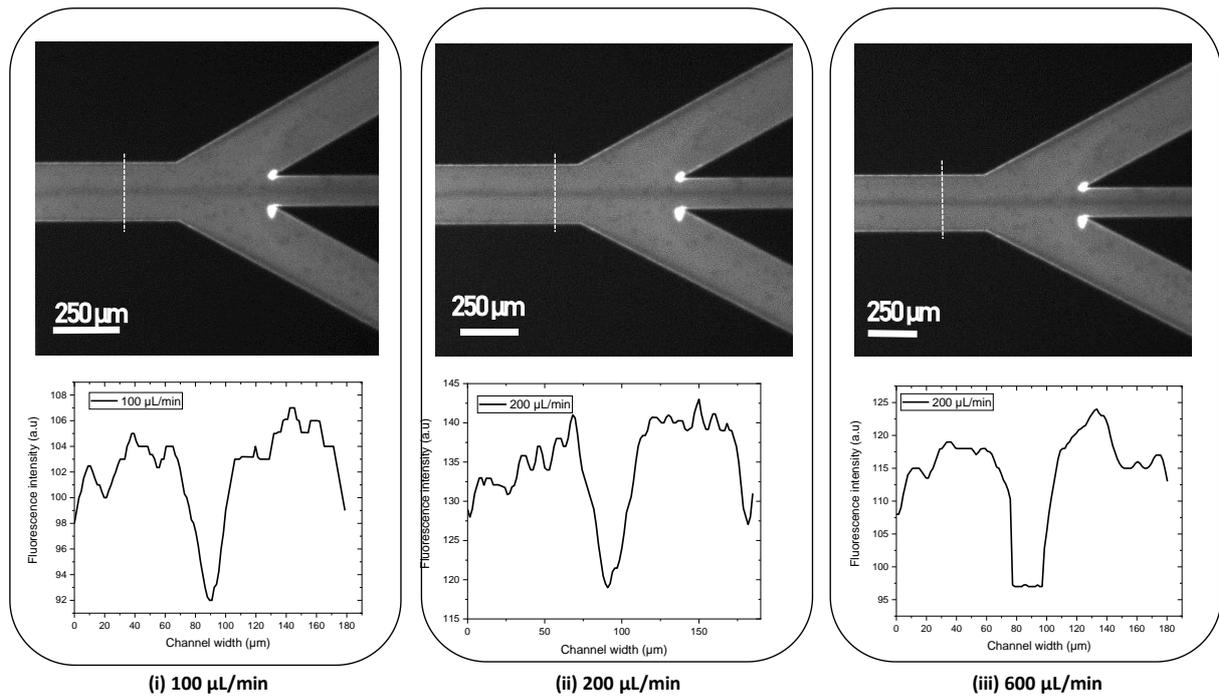


Figure 4. 16 Images des positions latérales des *E. Coli* et leurs profils d'intensité à la sortie du canal pour un débit de 100 µL/min (i), 200 µL/min (ii) et de 600 µL/min (iii).

L'analyse en pourcentage des bactéries collectées dans les deux sorties 1 et 2 est finalement donnée sur la figure 4.17 (ii) ci-dessous qui montre une pureté de 35 % dans la sortie 1 et de 65 % dans la sortie 2.

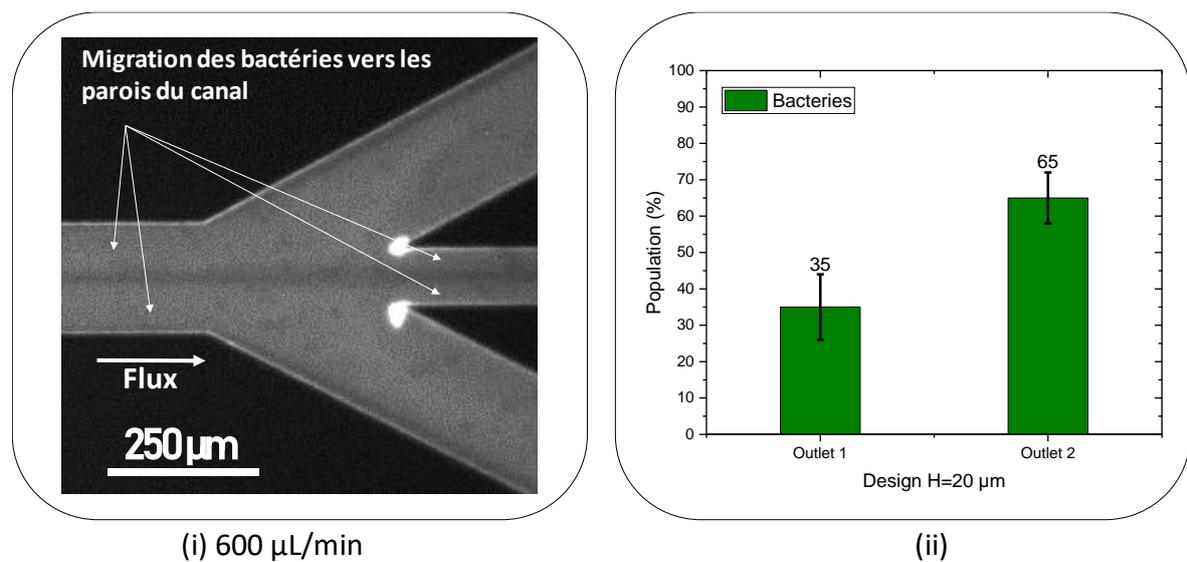


Figure 4. 17 (i) Image prise à la sortie du canal (ii) Pourcentage des bactéries collectées aux deux sorties 1 et 2 du canal.

Conclusion

Design 1 (h=40 μm) : Pour un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous avons réussi à trier les particules de 5 et de 15 μm avec une très haute sélectivité permettant d'attendre une pureté de 99,86 % des grosses particules de 15 μm dans la sortie 1 et une pureté de 98,93 % des petites particules de 5 μm dans la sortie 2 (canaux latéraux).

Design 2 (h=20 μm) : Pour un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous avons réussi à trier les petites particules de 2 μm avec une pureté de 87,8 % dans la sortie 2. Concernant les bactéries, nous avons également réussi à en collecter 65% dans la sortie 2.

En conclusion, les bactéries ne peuvent pas être triées de la même façon que les particules. Ceci provient sans doute de la différence de géométrie entre une bactérie et une particule. Habituellement, une bactérie *E. coli* a une forme bâtonnet, tandis que les particules utilisées dans mes tests ont une forme sphérique.

Chapitre 5 – Performance du module intégré (lyse et tri) : méthodes et mesures

Afin de faciliter l'extraction des agents pathogènes du sang, nous avons proposé de combiner les deux techniques de lyse (chapitre 3) et de tri inertiel (chapitre 4) inspirées des travaux respectifs de Zelenin [2] et Zhang [30] dans une même plateforme microfluidique intégrée. Nous avons précédemment démontré que la séparation des deux types de particules (5 et de 15 μm) dans le module de tri se fait à partir de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, ce qui correspond exactement au débit optimisé obtenu à la sortie du module de lyse (150 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 1 + 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 2 + 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 3). Pour ce module intégré, nous avons utilisé dans la partie tri le design 1 avec une hauteur de canal serpentin de 40 μm afin de diminuer l'effet de la résistance fluidique due à la différence de hauteur entre les deux modules (lyse et tri). Les performances de ce dispositif intégré en termes de lyse et de tri, ont été évaluées en analysant une solution de sang de cheval dopé par des particules fluorescentes.

1 Design

La figure 5.1 présente le design L-Edit intégré. Rappelons brièvement que la fabrication de cette plateforme double passe par la réalisation d'un moule en résine SU8 à 2 niveaux avec deux lithographies UV successives avec alignement, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2 (figure 2.6).

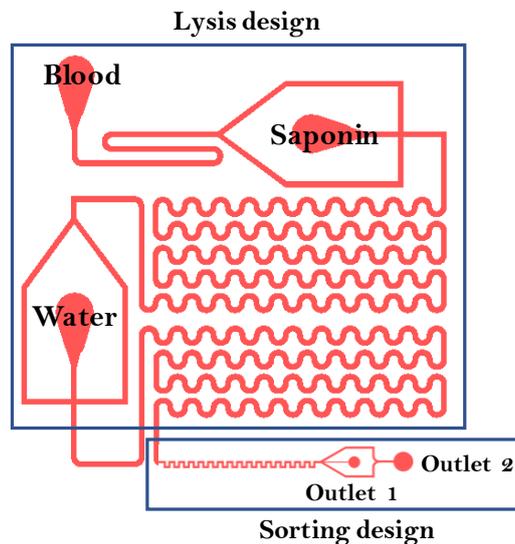


Figure 5. 1Design L-Edit du module intégré

2 Préparation des solutions

Nous avons réalisé des tests fluidiques avec du sang contenant des particules fluorescentes dans l'ensemble de la plateforme intégrée présentée en figure 5.1. Des particules de polystyrène fluorescentes d'un diamètre moyen de 5 μm et 15 μm respectivement, ont été mises en suspension dans du sang de cheval défibriné. La saponine a été préparée dans de l'eau déionisée à une concentration de 1% m/v.

3 Résultats et discussions

3.1 Lyse des cellules sanguines

Les débits fluidiques précédemment optimisés ont été utilisés pour la lyse du sang de cheval : le sang dopé a été injecté à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 1, la saponine 1% à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 2 et l'eau désionisée à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'entrée 3. La figure 5.2(i) présente une image de la puce sous flux sanguin. La solution collectée à la sortie de la puce a été analysée à l'aide du cytomètre en flux. La figure 5.2(iii) présente les matrices obtenues pour la solution de contrôle et pour le lysat collecté à la sortie de la puce à la fin de la lyse. **On peut observer la forte diminution du nombre de points bleus dans la région des cellules sanguines du**

diagramme qui confirme la lyse quasi-complète du sang. On remarque également le déplacement du nuage de cellules sanguines vers la gauche dans la région des débris, ce qui est caractéristique de la diminution de la taille et de la complexité des cellules. La figure 5.2(ii) représente le pourcentage de cellules sanguines survivantes dans le contrôle (99,1%) et la solution de lysat (0,03%).

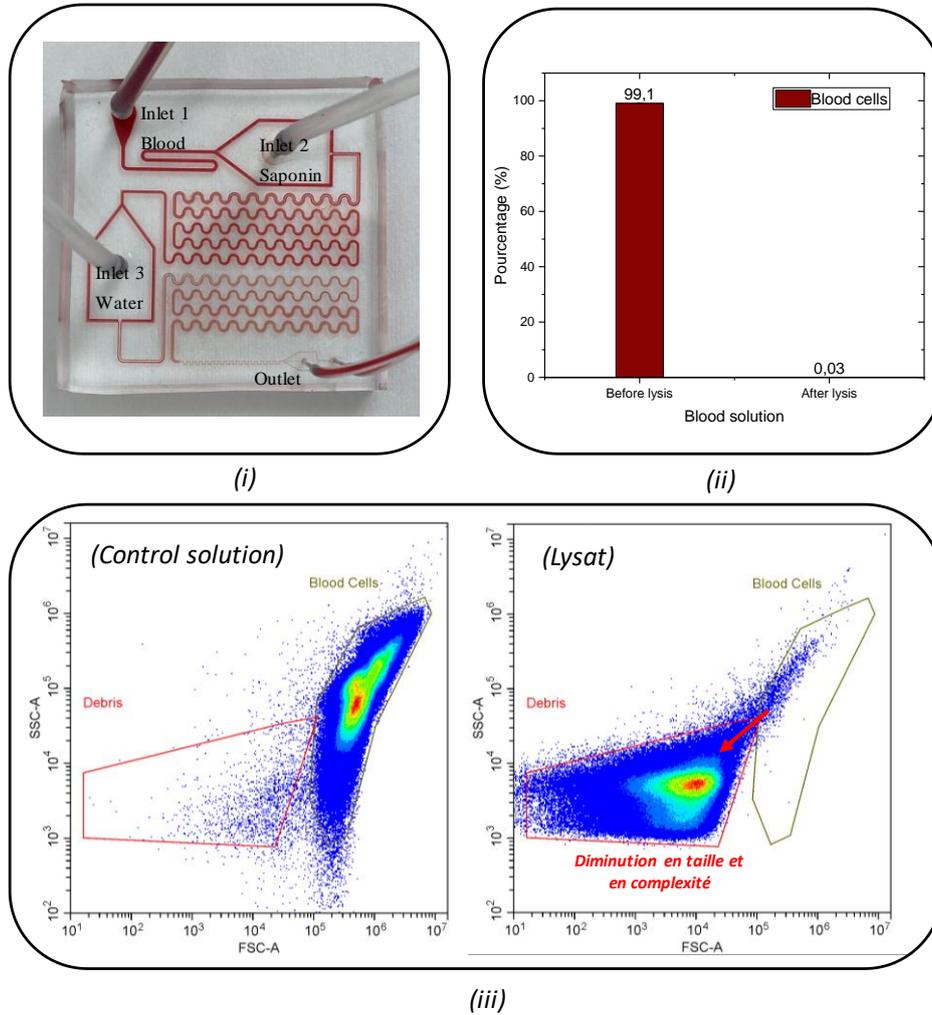


Figure 5. 2 (i) Puce sous flux sanguin, (ii) Pourcentage de cellules sanguines dans la solution avant et après lyse et (iii) Matrices avec acquisition de la diffusion directe (FSC) et de la complexité (SSC) permettant de classer les cellules sanguines selon leur taille et leur complexité.

3.2 Tri des particules

A l'entrée du module de tri, les particules étaient distribuées de manière aléatoire. Après plusieurs périodes de serpentins, les grandes particules (particules rouges) ont migré vers le centre du canal (dominées par les forces de Dean et centrifuges), tandis que les petites particules (particules vertes) ont occupé les deux côtés du canal en raison de la force nette de portance inertielle, comme observé sur la figure 5.3(i). Le profil d'intensité de fluorescence de

la figure 5.3(i) montre clairement les positions latérales distinctes des particules de 15 μm et de 5 μm .

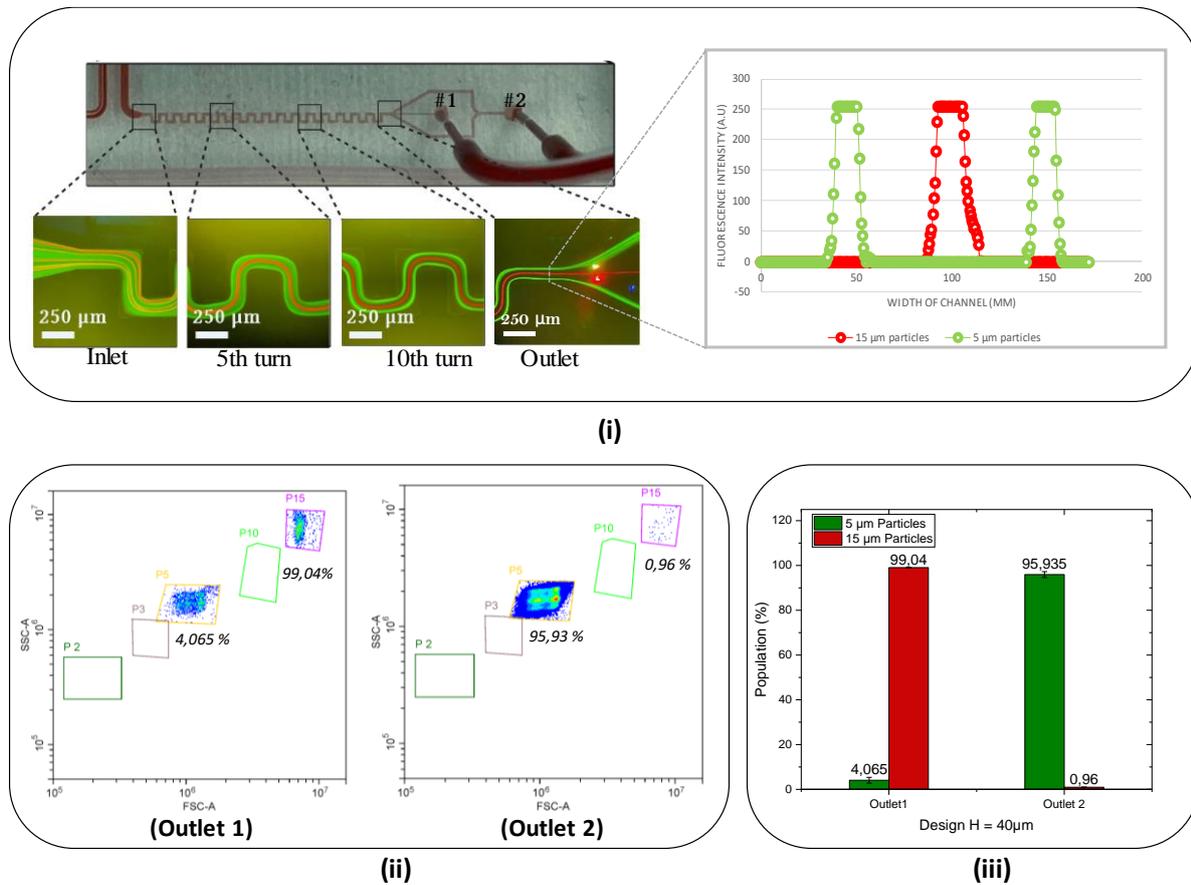


Figure 5. 3 (i) puce sous flux (module de tri) avec le profil d'intensité de fluorescence en coupe transversale du canal à la sortie de la puce, (ii) les données de cytométrie en flux des solutions collectées aux sorties #1 et #2, (iii) Pourcentage de particules collectées aux deux sorties 1 et 2.

Les solutions collectées à la sortie de la puce ont été analysées au cytomètre de flux. La figure 5.3(ii) présente les deux matrices obtenues pour les solutions collectées aux deux sorties 1 et 2. Après avoir analysé ces solutions, le pourcentage des particules collectées aux deux sorties 1 et 2 est donné sur la figure 5.3(iii) qui montre une très haute pureté de $\sim 99\%$ des grosses particules de 15 μm dans la sortie 1 et une pureté de $\sim 95\%$ des petites particules de 5 μm dans la sortie 2. Nous constatons une légère diminution de la pureté des petites particules par rapport aux résultats obtenus en section 1.4.1.3 du chapitre 4 (95% au lieu de 98%). Cette diminution est due au fait que nous avons couplé les deux modules de lyse et de tri ensemble, ce qui a créé une résistance fluïdique au niveau de l'intersection. Cette résistance affecte le débit appliqué entraînant une perturbation de la focalisation.

Conclusion

Nous avons réussi à lyser toutes cellules sanguines en triant les particules du lysat sanguin. Nous avons réussi à trier les particules de 5 et de 15 μm avec une très haute pureté de $\sim 99\%$ pour les grosses particules de 15 μm dans la sortie 1 et aussi une haute pureté de $\sim 95\%$ pour les petites particules de 5 μm dans la sortie 2 (canaux latéraux).

Chapitre 6 – Performance du module de détection électrochimique : méthodes et mesures

Dans ce chapitre, nous présentons un module de détection électrochimique d'ADN. Nous avons utilisé deux voies différentes pour l'immobilisation des sondes ADN. La première partie de ce chapitre décrit le protocole d'immobilisation des sondes d'ADNs par voie électrochimique, tandis que la deuxième partie présente le protocole d'immobilisation par voie chimique.

1 Module de détection électrochimique

Le biocapteur utilisé pour la détection de séquences cibles d'acides nucléiques, et **dont les étapes de fabrication ont été décrites dans le chapitre 2 (section 2)**, est une électrode métallique en platine intégrée sur du verre dans une puce microfluidique. Le capteur électrochimique a été déjà développé par l'équipe Biosys [98], [122], il est composé de deux paires d'électrodes en platine sur le même canal, chaque paire d'électrodes étant composée d'une grande contre-électrode (2 mm x 300 µm) et d'une petite électrode de travail (30 µm x 300 µm = $9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$) (figure 6.1).

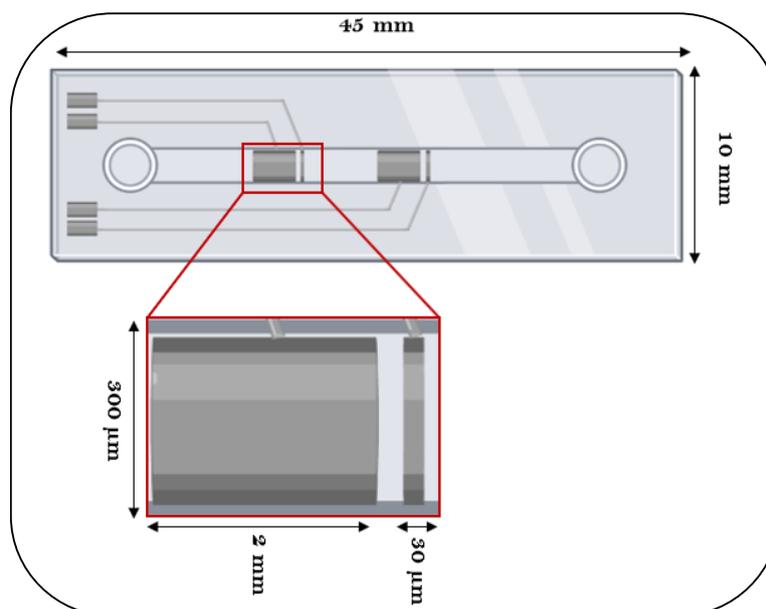


Figure 6. 1 Représentation schématique du dispositif microfluidique

Un biocapteur d'ADN est basé sur la reconnaissance par hybridation entre des séquences d'ADNs sondes à simple brin immobilisées sur la surface du transducteur, et des séquences complémentaires cibles. La liaison entre la sonde fixée en surface et son brin complémentaire cible est traduite par le transducteur en un signal électrique mesurable et affiché sur un ordinateur.

1.1 Montage à 2 électrodes

Un système électrochimique classique se compose généralement de trois électrodes : l'électrode de travail, l'électrode de référence et la contre-électrode liées à un électromètre. Le rôle principal de la contre-électrode est de laisser passer le courant par l'électrode de travail, sans passer par l'électrode de référence (en quelque sorte, la contre électrode permet de « fermer le circuit ») : ainsi, l'électrode de référence n'est pas polarisée et la portion de circuit

entre électrode de travail et électrode de référence ne contribue que faiblement à la chute ohmique en raison de la résistance non nulle de la solution d'électrolyte [85].

Afin de faciliter l'intégration de ces 3 électrodes dans des systèmes électrochimiques miniaturisés, des systèmes électrochimiques à deux électrodes sont de plus en plus utilisés pour faciliter la connectivité avec le potentiostat [123]. Ces systèmes sont composés d'une microélectrode comme électrode de travail et d'une électrode de grande surface comme contre électrode et électrode de référence [122]. Dans notre configuration, la contre-électrode joue en même temps le rôle de pseudo-référence grâce à sa grande taille [98].

1.2 Banc expérimental

L'étape initiale consiste à insérer la puce dans un PCB (printed circuit board) associé à un support imprimé 3D, fabriqué au laboratoire, qui permet de connecter les électrodes de la puce microfluidique à l'électromètre du potentiostat (Biologic SP-300, France). Les connexions fluidiques sont introduites et les solutions sont injectées à l'aide d'une pousse seringue (Nemesys, CETONI, Germany). Les fuites sont vérifiées par une étape de rinçage avec du NaCl 0,5 M comme électrolyte support pendant 5 min. Le banc expérimental est représenté sur la figure 6.2.

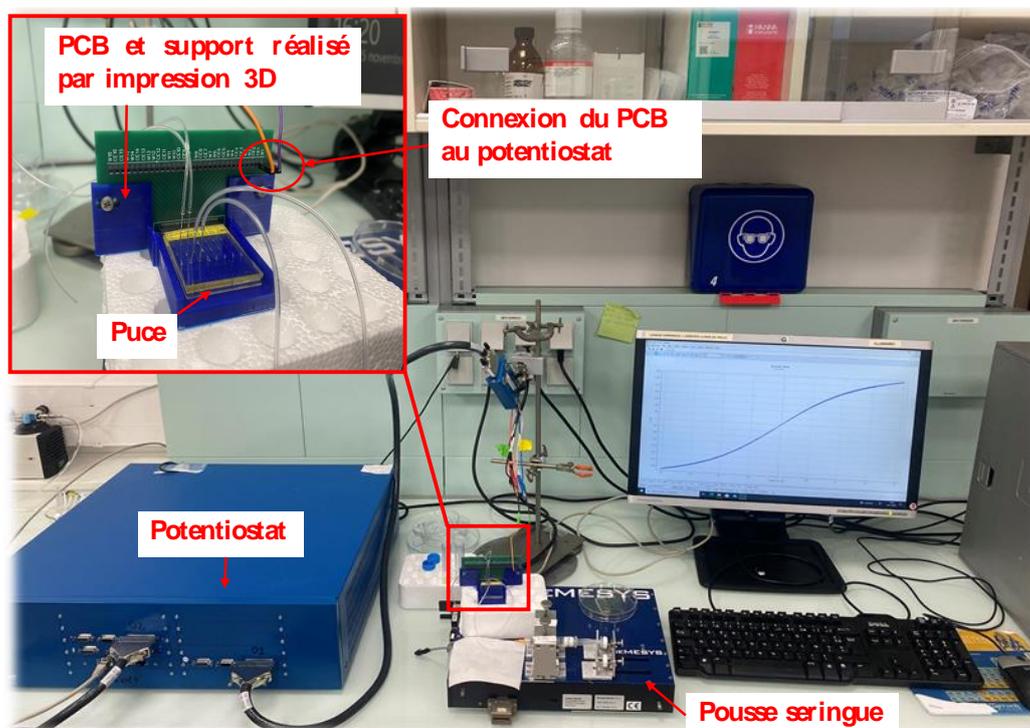


Figure 6. 2 Banc expérimental

1.3 Potentiostat

Lors des mesures électrochimiques, le potentiostat est un équipement indispensable pour mesurer à la fois la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, ainsi que le courant dans le circuit. En tant que générateur de signal, il est capable d'imposer et de contrôler les paramètres de tension ou de courant [85].

1.4 Séquences des gènes de résistance

Le gène de résistance est une portion d'ADN qui permet à la bactérie d'acquérir un mécanisme de défense contre des antimicrobiens. Les gènes de résistance varient en fonction de leur cible afin de bloquer le processus d'action des antibiotiques. Elles codent le plus souvent pour des enzymes capables d'inactiver, plus rarement de modifier l'affinité des antibiotiques pour leur cible [124].

Dans ma thèse, nous avons étudié la détection des gènes de résistance aux antibiotiques qui seront utilisés pour le diagnostic moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli*, principale bactérie responsable de sepsis grave.

La figure 6.3 ci-dessous présente les séquences de gènes de résistance étudiées durant cette thèse et dont les séquences synthétiques ont été commandées chez Eurogentec (France) sur les conseils d'Hervé Jacquier et Emmanuelle Cambau, hospitaliers spécialistes de la septicémie.

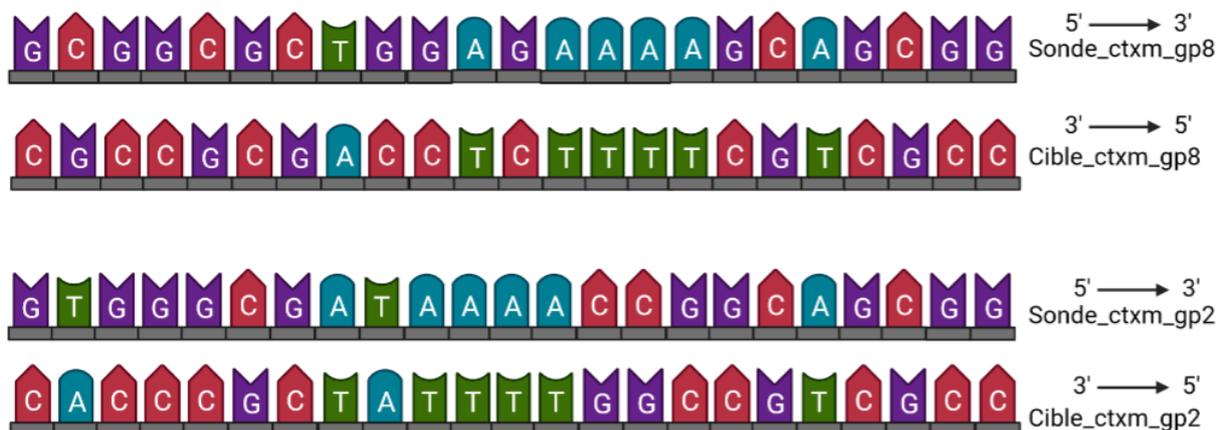


Figure 6. 3 Séquences d'acides nucléiques utilisées

Dans la quasi-totalité des expériences, nous avons utilisé la sonde d'ADN correspond au ctxm_gp8. Les résultats de détection avec cette sonde étaient plus stables que celles avec la

sonde correspond au ctxm_gp2. Les cibles gp2 ont été testées comme des brins non complémentaires afin d'étudier la spécificité de nos biocapteurs.

1.5 Méthode de mesure électrochimique

La voltammétrie cyclique est une méthode électrochimique bien connue pour étudier les réactions électrochimiques [125], [126]. Le principe général de la voltammétrie cyclique est d'obtenir la réponse en courant du système suite au balayage de potentiel provoquant la réaction électrochimique recherchée. Cette opération est réalisée en appliquant ou en modifiant progressivement le potentiel de l'électrode de travail. Par analogie, le tracé de courbes courant-potentiel ($I = f(E)$), appelées voltammogrammes, est destiné à étudier la relation entre l'intensité du courant traversant l'électrode et son potentiel [27]. Cette intensité est proportionnelle à la concentration et la vitesse de la réaction faradique d'oxydation ou de réduction de l'espèce électroactive en solution. La voltammétrie cyclique permet une détection d'acides nucléiques de l'ordre d'attomolaire [127].

2 Immobilisation des ADN sondes sur les microélectrodes en Pt et hybridation des acides nucléiques cibles

2.1 Immobilisation par voie électrochimique

Nous décrivons ici tout d'abord l'ensemble des réactions chimiques mises en jeu pour la préparation du biocapteur à la surface du Platine. La figure 6.4 présente les principales étapes de la construction du biocapteur d'ADN afin d'assurer un lien entre l'électrode de travail et l'ADN sonde.

La première étape consiste à greffer l'éthylènediamine par électro-greffage direct uniquement sur la surface platine.

La 2ème étape consiste à greffer chimiquement le sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC), qui se fixe par liaison covalente avec l'amine (voir figure 6.4, étape 2).

La troisième étape consiste à greffer la séquence d'ADN sonde couplée à un groupe sulfhydryle (Thiol commandé chez Eurogentec).

Enfin, **la dernière étape** est la plus importante puisque c'est la détection par l'hybridation du brin d'ADN cible sur son brin complémentaire.

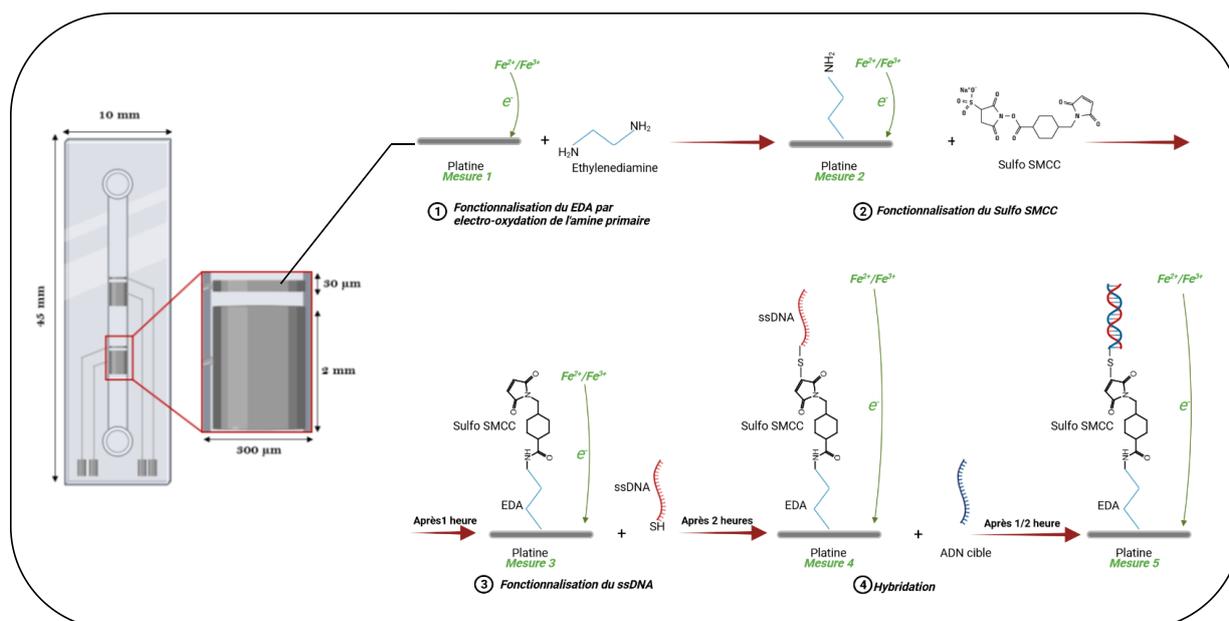


Figure 6. 4 Etapes de la construction du biocapteur d'ADN (Pt).

Nous décrivons ci-dessous et de manière détaillée, chaque étape de la formation du biorécepteur sur cette microélectrode.

2.1.1 Immobilisation de la séquence sonde

2.1.1.1 Etape 1 : Greffage électrochimique de l'éthylène diamine sur l'électrode de travail

Pour cette première monocouche chimique, nous avons choisi d'utiliser l'éthylène diamine qui est une petite molécule. Cette molécule possède un groupement amine (NH_2) susceptible de créer une liaison avec la surface de l'électrode après avoir subi une oxydation électrochimique générant des molécules avec des radicaux cations qui vont réagir pour former des liaisons (amide) avec l'électrode [128], [129] (voir figure 6.5). Il sera donc possible d'en greffer un très grand nombre sur la surface, pour augmenter ainsi les sites de reconnaissance biologique.

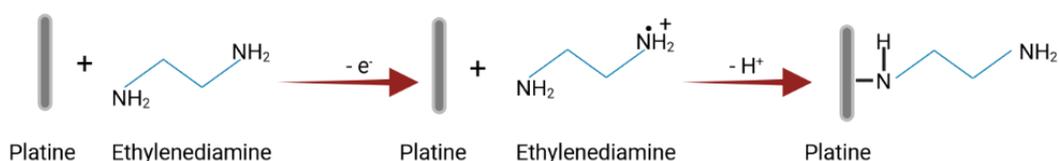


Figure 6. 5 Mécanisme d'électro-greffage de l'éthylènediamine

Cette approche d'immobilisation de l'amine sur des surfaces platine a été adaptée pour les milieux aqueux à partir du protocole en milieux organiques de Gallardo *et al.* [129]. Notre équipe a breveté ce protocole en optimisant les différents paramètres de la réaction de greffage

électrochimique, c'est-à-dire la gamme de balayage du potentiel appliqué, la vitesse de balayage de ce potentiel, le nombre de cycles appliqués et la concentration de l'espèce chimique à greffer [n° DI 2021-0031, FR 2112764]. Au final et après optimisation, les meilleures conditions de greffage pour obtenir une bonne stabilité de l'amine sont : (a) solution électrolytique : 1mM d'EDA dans 0,5 M de NaCl, (b) vitesse de balayage = 20 mV/s, (c) nombre de cycles appliqués : 10 et (d) gamme de balayage de potentiel : [0V ; 1,2V]. Cette étape est toujours suivie par un rinçage des électrodes avec de NaCl à 0,5M.

La figure 6.6 montre les 10 voltammogrammes successifs enregistrés au cours du greffage électrochimique de l'amine, qui a lieu pour une valeur du potentiel voisine de 1,2V. La diminution de l'intensité du courant des pics à 1,2V lors des cycles de balayage correspond à une diminution du transfert de charges, ce qui traduit une augmentation de sites greffés en surface de l'électrode.

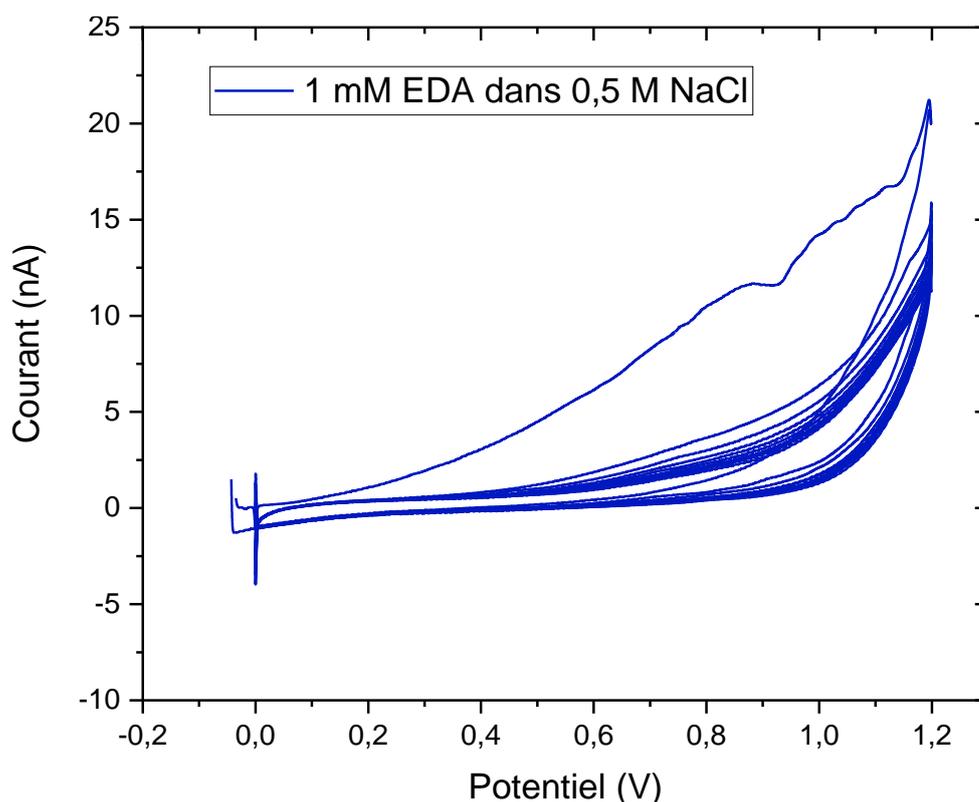


Figure 6. 6 Voltammogrammes obtenus au cours du greffage électrochimique de l'amine sur la surface platine

2.1.1.2 Etape 2 : Greffage chimique de Sulfo SMCC

Cette réaction est réalisée en insérant dans le canal microfluidique une solution Sulfo-SMCC à 10 mM pendant 1 h à température ambiante. Le Sulfo-SMCC est un agent de réticulation imperméable à la membrane et non clivable. Il contient un *N*-hydroxysuccinimide réactif aux

amines (ester NHS) et un groupe de maléimides réactif au sulfhydryle (figure 6.7). Les esters NHS réagissent avec les amines primaires pour former des liaisons amide stables. Cette étape est suivie par un rinçage avec de NaCl à 0,5 M pour obtenir un signal redox stable.

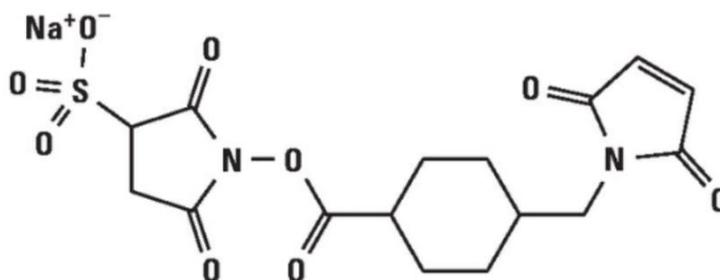


Figure 6. 7 La molécule Sulfo SMCC

2.1.1.3 Etape 3 : Greffage chimique de la séquence ADN sonde sur le Sulfo SMCC

Le greffage de la sonde d'ADN sur la couche Sulfo-SMCC est réalisé en insérant dans le canal microfluidique une concentration de sonde à 10^{-6} M pendant 2 h à température ambiante. Ces sondes sont couplées avec un groupe sulfhydryle (Thiol). Les maléimides du Sulfo-SMCC réagissent avec les groupes sulfhydryles pour former des liaisons thioéther stables. Comme pour chaque étape de greffage d'une espèce chimique, on effectue un rinçage soigneux de l'électrode avec de NaCl à 0,5 M.

2.1.2 Hybridation des brins d'ADN

Cette dernière étape d'hybridation est celle de la détection proprement dite des brins d'ADN complémentaires. Nous avons préparé plusieurs solutions d'ADN cible complémentaire diluées dans NaCl à 0,5M dans la gamme de concentrations allant de 10^{-18} M jusqu'à 10^{-6} M ainsi qu'une autre solution d'ADN non complémentaire. L'hybridation du brin d'acide nucléique complémentaire est réalisée en insérant dans le canal microfluidique une solution d'acides nucléiques cibles pendant 30 min.

2.1.3 Résultats et discussion

Le mode de transduction utilisé est basé sur la transduction électronique longue distance. Dans cette méthode de transduction, la monocouche de la sonde d'ADN immobilisée sur la surface de l'électrode porte une charge négative due à aux groupements phosphate. De plus, l'électrolyte de mesure utilisé comprend des sondes redox anioniques, à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Par conséquent, la charge négative de la couche d'ADN de la sonde empêche la diffusion de la sonde redox en solution vers l'électrode par répulsion électrostatique [130].

L'hybridation de séquences cibles complémentaires entraîne une compaction de la monocouche d'ADN sur l'électrode, conduisant à une densité accrue de charges négatives et restreignant la diffusion des sondes redox à travers cette couche. La présence de couches de double brin entraîne une diminution du courant mesuré par rapport aux couches de simple brin. Cette différence de courant est utilisée pour détecter l'hybridation des séquences cibles.

Les mesures électrochimiques sont réalisées à différents moments de l'expérience. Dans ce protocole d'immobilisation par voie électrochimique, la mesure a été effectuée avant et après chaque étape de préparation de l'électrode en platine, c'est-à-dire, 5 étapes : **1)** sur les électrodes nues pour les caractériser et connaître les niveaux de courants initialement présents, **2)** après l'étape de l'électro-greffage de l'éthylènediamine afin de connaître le nouveau niveau de courant lié à la création d'un film de polyéthylène diamine à la surface de l'électrode, **3)** après l'étape de la fonctionnalisation du Sulfo-SMCC, **4)** après immobilisation des ADN sondes et enfin **5)** après l'étape d'hybridation pour évaluer le taux d'hybridation des cibles aux sondes préalablement immobilisées sur les électrodes. Entre chaque étape, une solution d'électrolyte est injectée dans la puce à un débit de 0,5 µL/s.

Dans notre application, nous avons utilisé le couple ferricyanure $[Fe(CN)_6^{3-}]$ / ferrocyanure $[Fe(CN)_6^{4-}]$ comme couple de sondes redox de la solution électrolyte dont l'équation d'oxydo-réduction est la suivante :



Dans cette solution, les formes oxydée et réduite de la sonde sont utilisées à la même concentration de 20 mM. Cela nous permet d'obtenir des voltammogrammes symétriques pour l'oxydation et la réduction. Une légère asymétrie des niveaux de courants aux plateaux de diffusion peut être observée due à la différence entre les coefficients de diffusion du ferricyanure et du ferrocyanure [122].

Nous avons utilisé la voltammétrie cyclique comme méthode pour étudier la cinétique du transfert de charge entre l'électrolyte et la surface platine (électrode de travail). La mesure électrochimique qui consiste en une voltammétrie cyclique est réalisée avec le logiciel EC-Lab, entre -0,2 V et + 0,2V, avec une vitesse de balayage de 10 mV/s. Les voltammogrammes correspondants à chaque étape de greffage de ces espèces chimiques sont visibles sur la figure 6.8 ci-dessous.

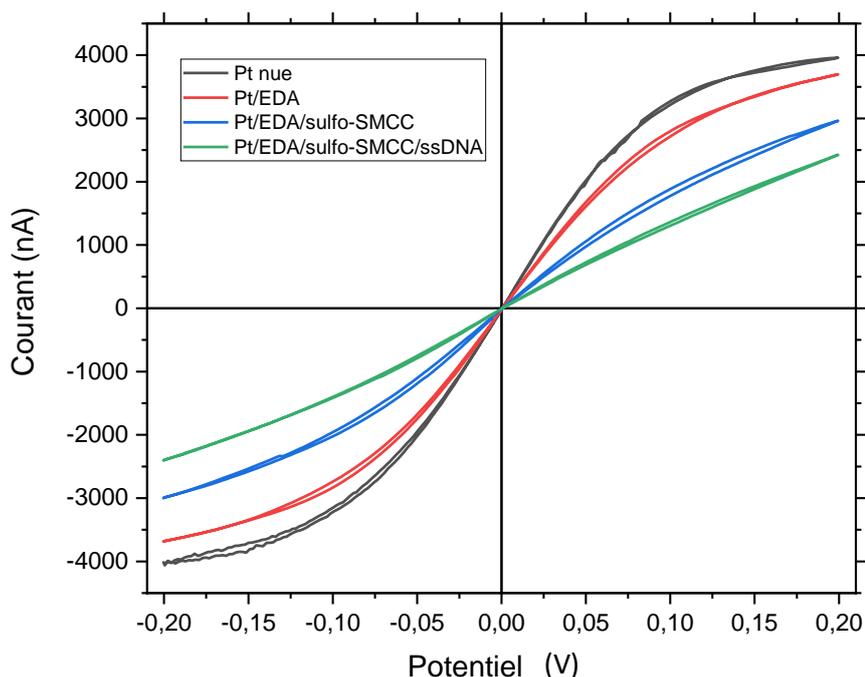


Figure 6. 8 Voltammogrammes obtenus en microfluidique, dans une solution de ferri / ferrocyanure 20 mM et NaCl 0,5 M (courbe noir), après immobilisation de l'EDA (courbe rouge), immobilisation du Sulfo SMCC (courbe bleue) et après immobilisation de la séquence d'ADN sonde (courbe verte)

Il apparaît clairement que la densité du courant diminue après chaque étape de modification de surface indiquant l'immobilisation de ces espèces chimiques à la surface de l'électrode. Cette diminution est causée par le ralentissement du transfert d'électrons lié à l'effet de l'augmentation de l'épaisseur des couches greffées en surface de l'électrode.

Nous avons également suivi la détection de l'ADN toujours grâce à la voltammétrie cyclique en faisant varier, par additions successives, la concentration de la solution d'ADN cible complémentaire (figure 6.9). Chaque greffage successif se traduit par la diminution de la densité du courant après chaque augmentation de la concentration qui correspond à une augmentation du nombre de brins d'ADN hybridés. Cette diminution du courant confirme la bonne hybridation d'ADN.

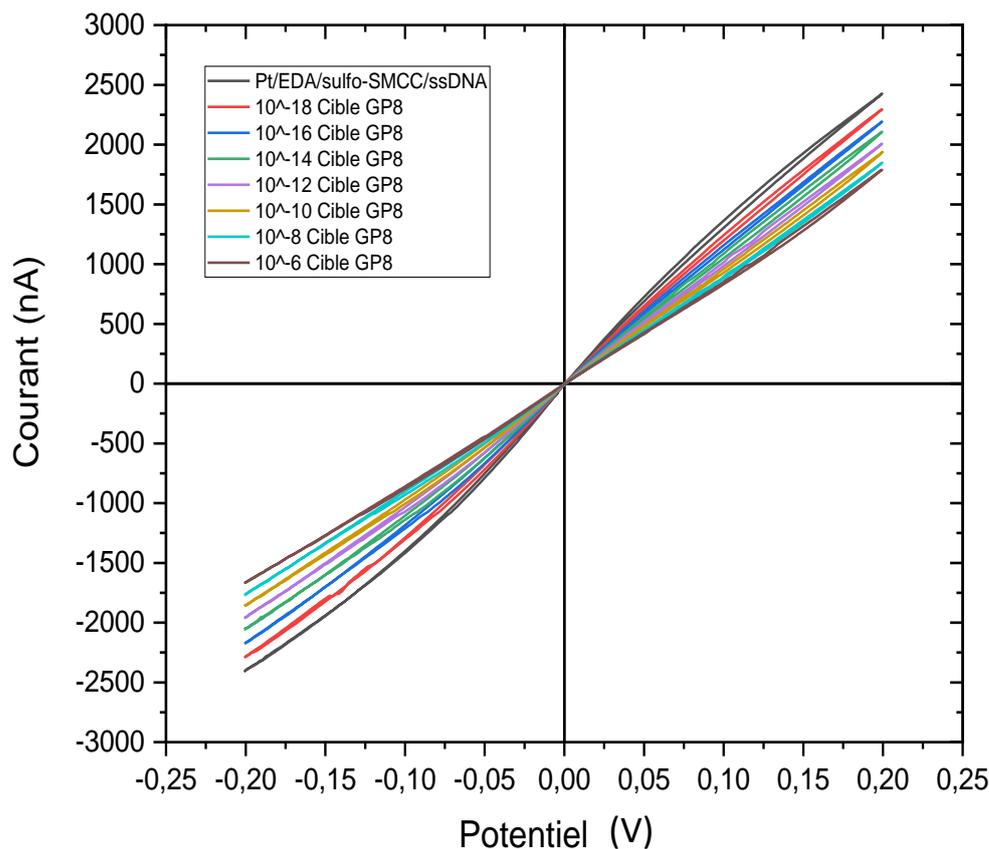


Figure 6. 9 Suivi de l'hybridation de l'ADN par Voltammétrie Cyclique

2.1.4 Détection électrochimique du brin complémentaire

Afin de limiter la prise en compte de l'adsorption non spécifique de contaminants (molécules indésirables) sur la surface platine qui provient des fluides injectés dans le canal (NaCl, électrolyte, etc..) et qui provoque une diminution de la sensibilité de la détection, les puces microfluidiques sont à usage unique. De plus, les conditions de fabrication en salle blanche peuvent varier d'un jour à l'autre, ce qui entraîne une variabilité de la qualité des électrodes obtenues d'une puce à une autre et implique des niveaux de courants différents d'une expérience à une autre.

Pour contre carrer cela, la méthode de détection de l'hybridation est basée sur la soustraction du courant de sondes en valeur absolue, I_{ss} , au courant de cibles en valeur absolue, I_{ds} , divisé par le courant de sondes en valeur absolue, I_{ss} . Cette normalisation est définie comme :

$$I_{norm} = \frac{|I_{ss} - I_{ds}|}{|I_{ss}|} \quad \text{Équation 35}$$

La figure 6.10 présente un exemple de courbe de calibration obtenue après normalisation des niveaux de courants.

La courbe de calibration montre qu'une faible limite de détection de l'ordre de $10^{-18}M$ a été obtenue.

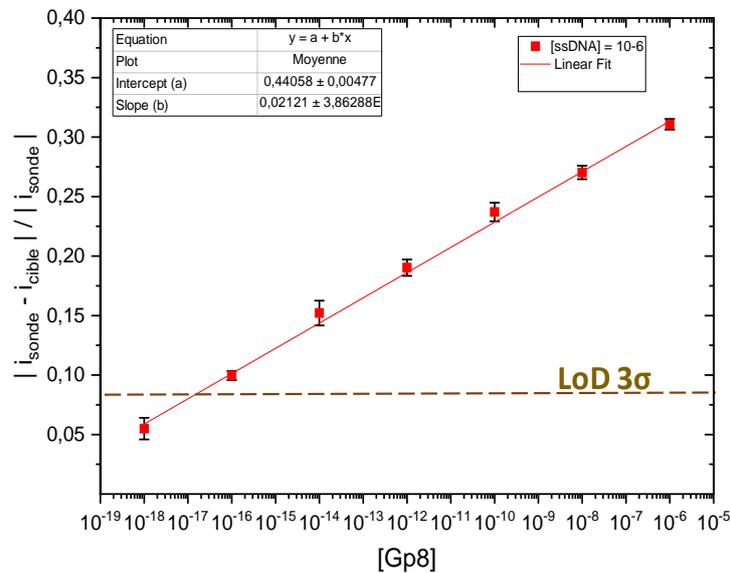


Figure 6. 10 Courbe de calibration d'une séquence cible complémentaire à la séquence sonde Gp8 après la normalisation des niveaux de courants

2.1.5 Spécificité de la détection électrochimique

Afin de vérifier la fiabilité de notre biocapteur au niveau de la spécificité, nous avons aussi testé la détection des brins NC (non complémentaires) dans les mêmes conditions que celle effectuée avec les brins d'ADN complémentaires (voir figure 6.11).

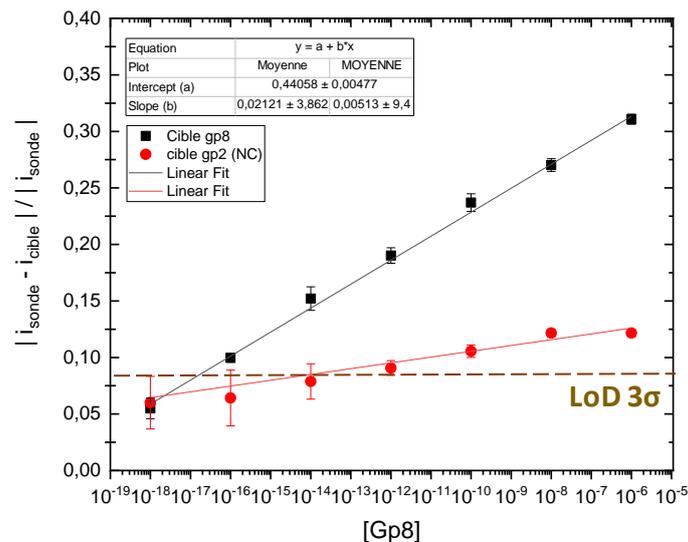


Figure 6. 11 Courbe de calibration d'une séquence cible complémentaire à la séquence sonde Gp8 (courbe noire) comparée au courbe de calibration pour une séquence cible Gp2 non-complémentaire de la sonde (courbe rouge).

Nous pouvons tout de suite distinguer les deux courbes. Effectivement, aucune hybridation entre la sonde et la cible NC ne se produit quelle que soit la concentration en cibles injectées dans la puce.

Grace à ce biocapteur, nous avons réussi à détecter, en 30 minutes, une concentration d'ADN complémentaire minimale de 10^{-18} M. Toutefois, la spécificité se situe autour de 10^{-16} M en présence d'un brin non complémentaire.

La partie suivante décrit la deuxième technique d'immobilisation utilisée dans ma thèse : immobilisation par voie chimique.

2.2 Immobilisation par voie chimique (Pt-Thiol)

Ce protocole d'immobilisation a été développé dans notre équipe par moi-même et Martina FREISA. Il est toujours en cours d'optimisation. Je vous présente ci-dessous les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec ce protocole.

2.2.1 Fonctionnalisation de la séquence sonde

Le greffage de la sonde d'ADN sur la surface du platine par voie chimique est réalisé en insérant dans le canal microfluidique une solution sonde à 10^{-6} M pendant 2h à température ambiante. Ces sondes sont couplées avec un groupe sulfhydryle (Thiol). Grâce à cette fonction thiol en extrémité de brin, les ADN sondes se lient spontanément aux atomes de platine, permettant la formation spontanée d'une monocouche auto-assemblée d'ADN sondes [131] [132]. En effet, les groupes sulfhydryles, tels que le thiol (R-SH), présentent une chimisorption spontanée sur les métaux comme l'or, l'argent, le nickel et le platine. Un rinçage soigneux de l'électrode avec l'électrolyte (NaCl à 0,5 M) est effectué afin de stabiliser la couche d'ADN sondes sur les électrodes de platine.

2.2.2 Hybridation de la séquence cible

L'étape d'hybridation est celle de la détection proprement dite des brins d'ADN complémentaires. J'ai préparé plusieurs solutions d'ADN cible complémentaire diluées dans NaCl à 0,5M dans la gamme de concentrations allant de 10^{-18} M jusqu'à 10^{-6} M ainsi que des autres solutions d'ADN non complémentaire. L'hybridation du brin d'acide nucléique complémentaire est réalisée en introduisant dans le canal microfluidique une solution d'acides nucléiques cibles pendant 30 min.

2.2.3 Résultats et discussion

Afin d'obtenir une bonne fonctionnalisation de l'ADN sonde et une bonne hybridation de l'ADN cibles, plusieurs étapes d'optimisation ont été effectuées afin de préparer la solution d'ADN sondes.

2.2.3.1 Effet du TCEP sur l'immobilisation des ADN sondes

La conservation des acides nucléiques sondes en suspension **pendant longtemps** peut être à l'origine de la création des ponts disulfure entre les fonctions thiols en extrémité des brins d'ADN. Ces ponts disulfures (liaison S-S) sont des liaisons covalentes qui se forment par oxydation dans les protéines, de manière post-traductionnelle (voir la figure 6.12 ci-dessous où les groupes R représentent le reste de l'acide aminé).

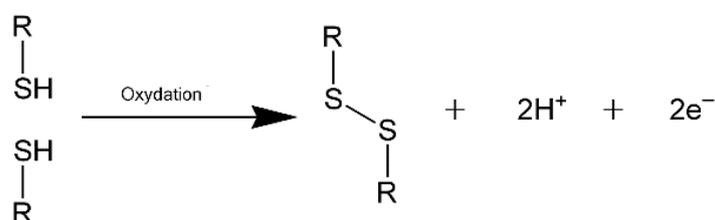


Figure 6. 12 Création de pont disulfure

Afin d'éviter la création de ces ponts qui vont entraver les liaisons Thiol-Pt et ainsi limiter la fonctionnalisation des sondes d'ADN, nous avons dilué notre solution d'ADN sonde avec du tris(2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP). Le TCEP est un agent réducteur préparé et utilisé sous forme de sel de chlorhydrate (TCEP-HCl). Il est soluble dans l'eau et disponible sous forme de solution stabilisée à pH neutre. Dans notre application, nous avons utilisé le TCEP (chez Thermo Fisher scientifique) pour réduire les ponts disulfures comme présenté dans la figure 6.13 ci-dessous.

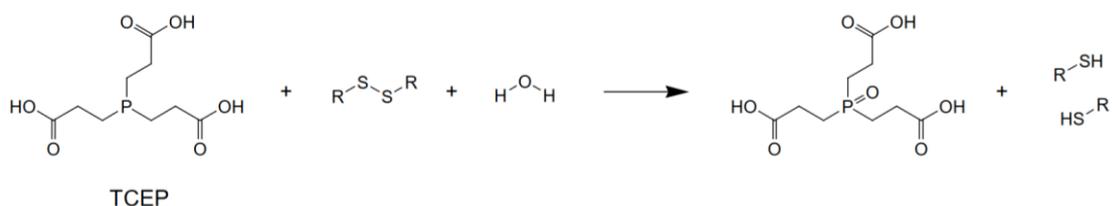


Figure 6. 13 Réduction des liaisons disulfure organiques à l'aide de TCEP

Dans ma thèse, et afin de choisir une concentration optimale du TCEP, nous avons préparé plusieurs solutions d'ADN en ajoutant du TCEP à différentes concentrations allant de 0.01 mM jusqu'à 100 mM (figure 6.14).

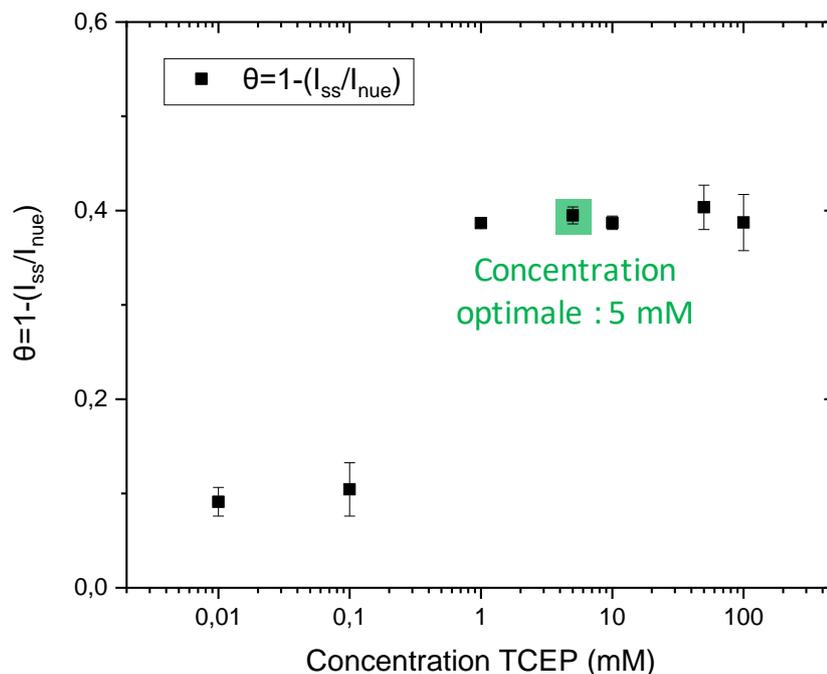


Figure 6. 14 Effet du TCEP sur la fonctionnalisation des sondes d'ADN

L'influence des concentrations croissantes de TCEP de 0,01 à 100 mM mélangées à une même concentration d'ADN sonde sur le taux de greffage (θ) est donnée par l'équation 36 et est illustré à la figure 6.14 (nous avons mélangé 10 μ L de la solution TCEP dans 90 μ L de la solution d'ADN sonde à 10^{-5} M afin d'obtenir une solution finale d'ADN sonde à 10^{-6} M). En pratique, le taux de greffage correspond au tracé de la normalisation entre I_{ss} (courant de sonde ADN) et I_{nue} (courant initial) divisé par I_{nue} . La variation du taux θ atteint un plateau qui indique la saturation des groupes SH disponibles grâce à la réduction des ponts disulfure (présence de TCEP) pour le greffage. Comme illustré sur la figure 6.14, la surface active, c'est-à-dire la surface non occupée par les sondes ADN-SH (ligand) est accessible pour le couple redox électroactif. Dans ce cas, la fraction de surface de la microélectrode de platine greffée avec des ligands peut être estimée comme suit :

$$\theta = 1 - \frac{I_{ss}}{I_{nue}} \quad \text{Équation 36}$$

L'évolution expérimentale du taux de greffage est tracée sur la figure 6.15 selon l'équation (37) et la courbe expérimentale est modélisée avec l'équation de Hill-Langmuir [133], comme suit :

$$\theta = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_A}{[TCEP]}\right)^n} \quad \text{Équation 37}$$

où K_A représente la concentration de TCEP qui produit une réponse semi-maximale (demi occupation), et n est le coefficient de Hill lié au degré de coopérativité entre les premiers ligands et les suivants tout au long de l'étape d'immobilisation de la sonde en présence de TCEP : si $n < 1$, la coopérativité tend à diminuer, si $n=1$, il n'y a pas de coopérativité, si $n > 1$, la coopérativité tend à augmenter.

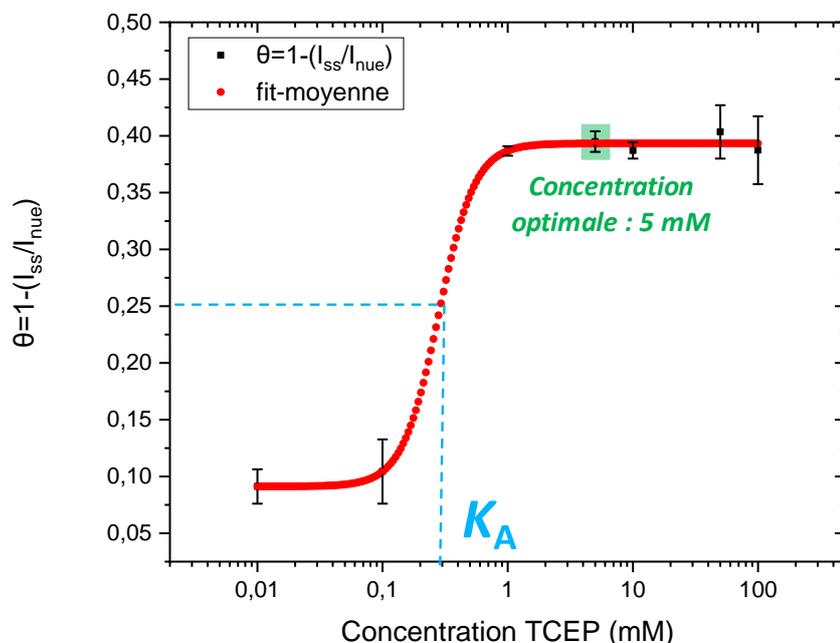


Figure 6. 15 Evolution expérimentale du taux de greffage de surface simulée avec l'isotherme de Hill-Langmuir selon l'équation (37) où les paramètres K_A , n et θ_{max} sont égaux respectivement à $(0,28 \pm 0,07)$ mM, $(2,99 \pm 0,69)$ et $(0,393 \pm 0,004)$.

Le résultat de la procédure d'ajustement à l'aide de l'équation (37) est illustré à la figure 6.15. Les valeurs obtenues de K_A et n sont respectivement de $(0,28 \pm 0,07)$ mM et $2,99 \pm 0,69$. Cette dernière valeur confirme une excellente coopérativité entre ligands lors de la procédure d'immobilisation en présence du TCEP. Le plateau est observé ($\theta_{max} = 0,393 \pm 0,004$) pour la plage de concentration élevée (1-100 mM) et suggère que le total des sites d'adsorption (disponible lors de fonctionnalisation) sur microélectrode de platine est atteint et ne représente que 39,3% de la surface active de la microélectrode.

La surface maximale couverte par les sondes ADN est donc estimée à $A_{max} = 3.54 \times 10^{-5}$ cm² en tenant compte du fait que la surface d'électrode de travail (S_{WE}) est égale à 9×10^{-5} cm². La section occupée par une molécule d'ADN peut être modélisée comme un disque de rayon de 1 nm conduisant à une surface occupée d'ADN sonde = 3.14×10^{-14} cm² par molécule. Le nombre maximum, N_{max} , d'ADN immobilisé représente le rapport entre A_{max} et A_{ssDNA} soit $1,13 \times 10^9$ molécules et la densité de site de liaison est déduite avec le rapport entre N_{max} et S_{WE} soit

1.25×10^{13} molécules. cm^{-2} . Cette dernière valeur est cohérente avec la quantité maximale d'ADN fixée sur une surface et elle est proche de la valeur obtenue sur d'autres matériaux de la littérature [98], [134]–[136].

Dans la suite des expériences, nous avons choisi 5mM comme concentration optimale. La figure 6.16 présente les voltammogrammes pour 1) la surface platine nue, 2) après immobilisation de la séquence d'ADN sonde sans TCEP (courbe rouge), et 3) après immobilisation de la séquence d'ADN sonde avec TCEP (courbe bleue).

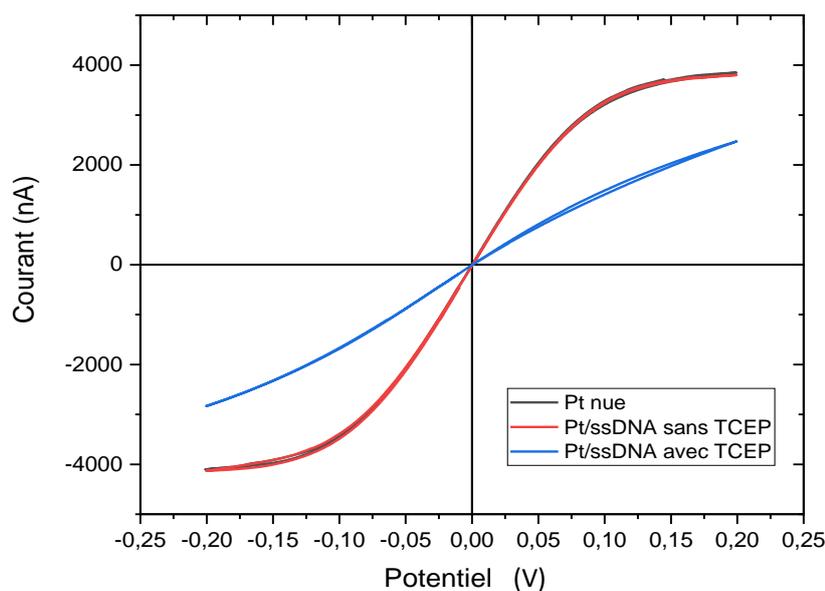


Figure 6. 16 Voltammogrammes obtenus en microfluidique, dans une solution de ferri / ferrocyanure 20 mM et NaCl 0,5 M (courbe noire), après immobilisation de la séquence d'ADN sonde sans TCEP (courbe rouge), après immobilisation de la séquence d'ADN sonde avec TCEP (courbe bleue).

Nous remarquons qu'après l'immobilisation de la séquence d'ADN sonde avec TCEP à 5 mM, le niveau de courant diminue (courbe bleue), ce qui signifie que la fonctionnalisation des sondes d'ADN a bien fonctionné.

2.2.3.2 Effet du 6-mercapto-1-hexanol (MCH) sur l'hybridation des ADNs cibles

Après l'immobilisation des ADNs sondes, nous avons rencontré un problème d'hybridation des ADNs cibles. Ce problème est lié au fait que les sondes d'ADN immobilisés sur la surface platine sont mal orientées. Cela est dû à une forte affinité entre la surface de Pt et le squelette oligonucléotidique [137].

Pour mieux orienter les sondes d'ADN à la surface et occuper l'espace libre entre elles, des petites molécules telles que le 6-mercaptopropionol (MCH) ont été utilisées pour bloquer les sites actifs et prévenir l'adsorption non spécifique. Le MCH a la capacité de déplacer les parties non spécifiques des sondes d'ADN qui se sont déjà adsorbées, permettant ainsi leur orientation verticale. Ceci est dû à la répulsion entre le dipôle négatif net de l'alcool terminal du MCH et les squelettes d'ADN chargés négativement.

Au cours de ma thèse, j'ai mélangé une solution d'ADN sonde avec une solution de MCH afin de maintenir une concentration constante d'ADN sonde (10^{-6} M) [138], [139]. La figure 6.17 présente le protocole d'immobilisation des sondes d'ADNs avec et sans introduction du MCH.

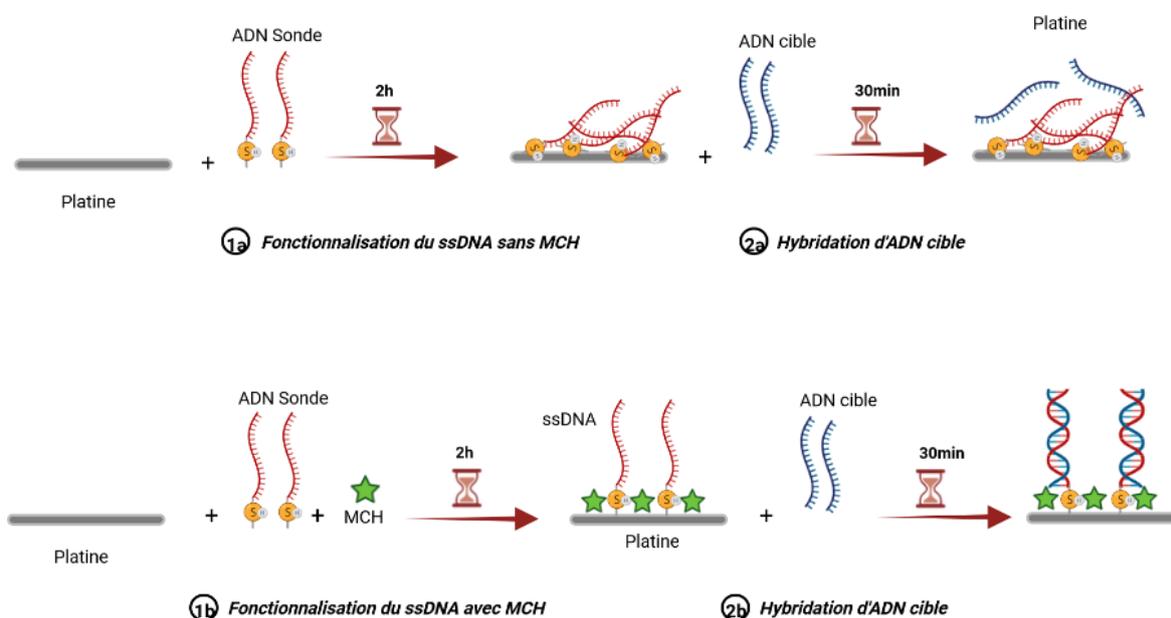


Figure 6. 17 Effet du MCH lors des étapes de la construction du biocapteur d'ADN (Pt).

Comme pour le TCEP, différentes concentrations de MCH ont été évaluées pour sélectionner la concentration la plus appropriée : 10^{-1} M, 10^{-2} M, 2.5×10^{-2} M et 5×10^{-2} M. La normalisation du courant d'hybridation est basée sur la soustraction du courant de sondes, I_{ss} , au courant de cible en valeur absolue, I_{sd} , divisé par le courant de sonde, I_{ss} :

$$I_{norm} = \frac{|I_{ss} - I_{sd}|}{|I_{ss}|} \quad \text{Équation 38}$$

Les courbes de calibration correspondant à chaque concentration sont présentées dans la figure 6.18.

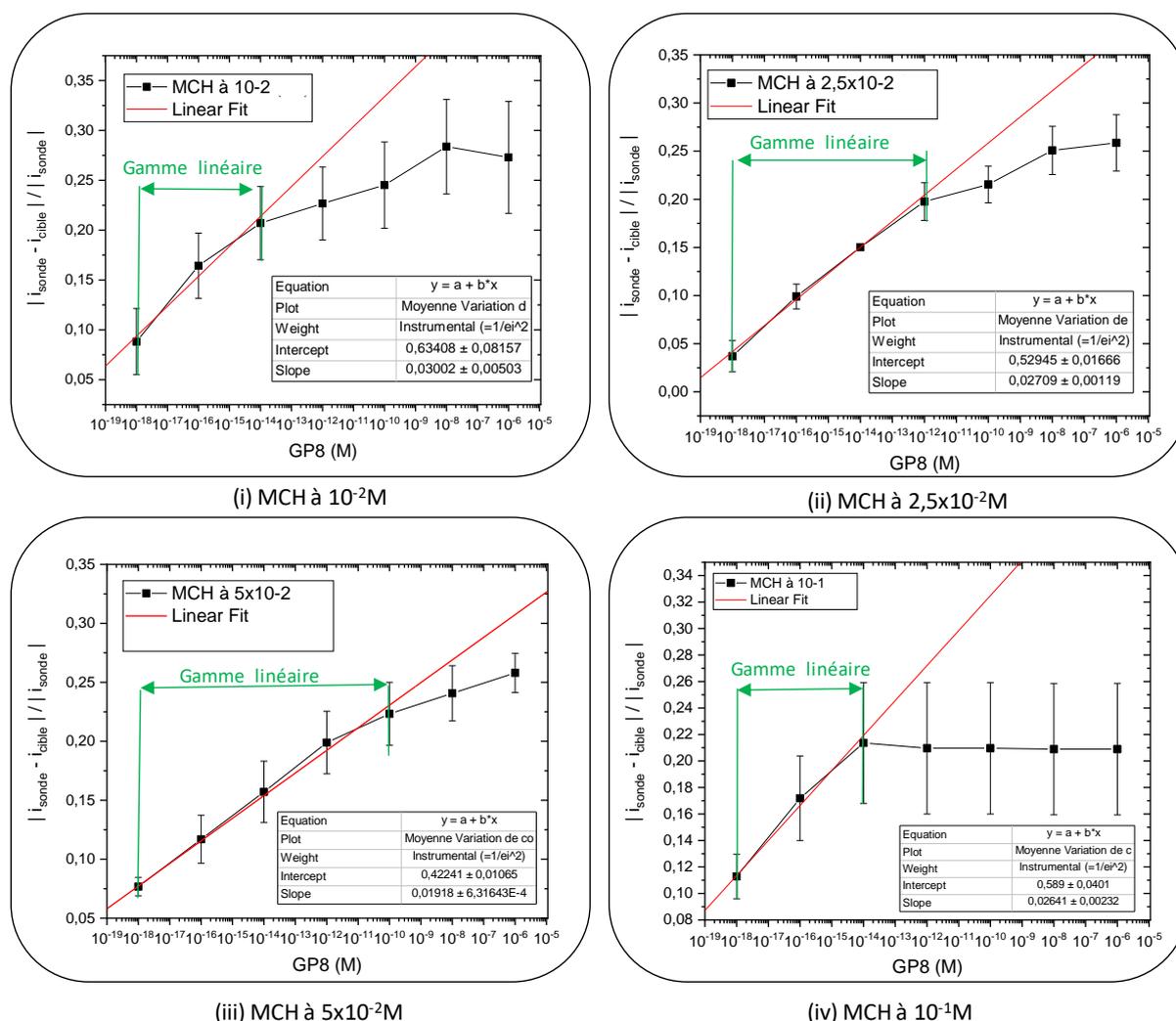


Figure 6. 18 Courbes de calibration à différentes concentrations du MCH, (i) MCH à $10^{-2}M$, (ii) MCH à $2.5 \times 10^{-2}M$, (iii) MCH à $5 \times 10^{-2}M$, (iv) MCH à $10^{-1}M$. Chaque point correspond à 4 mesures.

La figure 6.18 (i) présente la courbe de calibration de l'hybridation pour une concentration de $10^{-2}M$ du MCH, c'est-à-dire un rapport 1 :10000 (ADN : MCH). À faible concentration, la courbe a une partie linéaire. Au-delà de $10^{-14}M$, la courbe atteint un plateau, ce dernier signifie un début de saturation de la surface. Les mêmes tendances ont été obtenues avec des concentrations de MCH plus élevées, la courbe atteint le plateau à partir de $10^{-12}M$ pour une concentration de MCH à $2.5 \times 10^{-2}M$ (figure 6.18 (ii)), et un plateau à partir de $10^{-10}M$ pour une concentration de MCH à $5 \times 10^{-2}M$ (figure 6.18 (iii)).

La figure 6.18 (iv) présente la courbe de calibration de l'hybridation pour une concentration de $10^{-1}M$ du MCH. Nous remarquons que la courbe atteint rapidement un plateau, ce qui indique la saturation plus rapide de la surface. D'après le résultat obtenu à la figure 6.18, nous

choisissons $5 \times 10^{-2} M$ comme concentration optimale de MCH (gamme de linéarité plus grande).

La figure 6.19 compare la détection de l'ADN cible à l'ADN sonde pour les deux cas différents : avec et sans introduction du MCH. Les résultats sont présentés sous forme de courbes de calibrations. Nous remarquons que les deux courbes sont facilement distinguables. Dans le cas de l'introduction du MCH (courbe noire), la courbe augmente avec l'augmentation de la concentration des cibles complémentaires, ce qui signifie l'augmentation de la couverture de l'électrode par les ADN cibles et donc de l'hybridation.

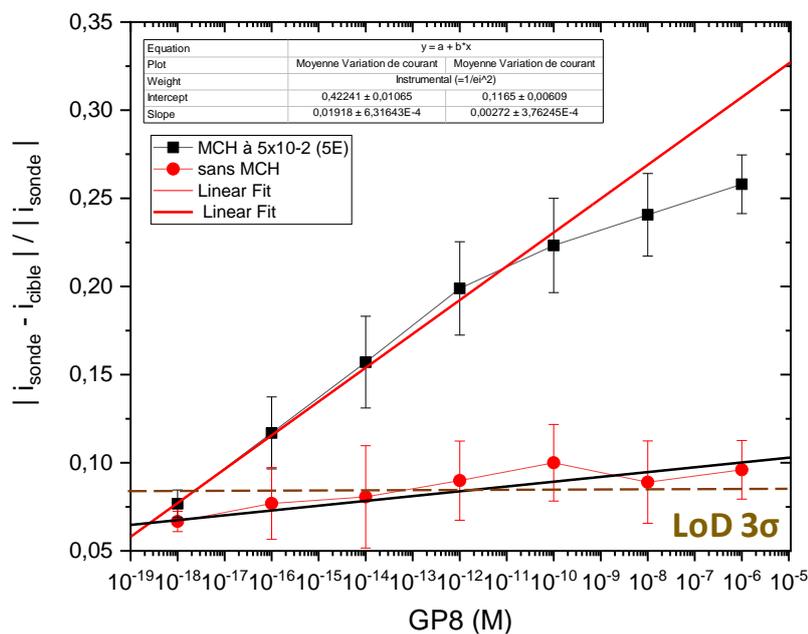


Figure 6. 19 Courbes des calibrations correspondant à l'hybridation d'ADN avec (courbe noire) avec la concentration optimale ($5 \cdot 10^{-2} M$) et sans l'introduction du MCH (courbe rouge). Chaque point correspond à 5 mesures.

Par contre, dans le cas contraire (sans introduction du MCH), aucune hybridation (voire très faible) n'a lieu entre la sonde et la cible, ce qui n'entraîne aucune diminution de courant (courbe rouge), peu importe la concentration en cibles injectée dans la puce.

2.2.3.3 Protocole optimisé (TCEP à 5mM, MCH à $5 \times 10^{-2} M$)

Les mesures électrochimiques sont réalisées à différents moments de l'expérience. Tout d'abord, sur les électrodes nues pour les caractériser et connaître les niveaux de courants initialement présents. Ensuite, après immobilisation des ADN sondes pour connaître le nouveau niveau de courant lié au greffage des sondes sur la surface en platine. Enfin, après l'étape d'hybridation pour évaluer le taux d'hybridation des cibles aux sondes préalablement

fixées sur les électrodes. Entre chaque étape, une solution d'électrolyte est injectée dans la puce à un débit de $0,5 \mu\text{L/s}$.

Après avoir optimisé la concentration du TCEP (5mM) et du MCH ($5 \times 10^{-2}\text{M}$) dans la solution ADN sondes, les voltammogrammes correspondant à chaque étape de greffage des espèces chimiques sont visibles sur la figure 6.20 ci-dessous.

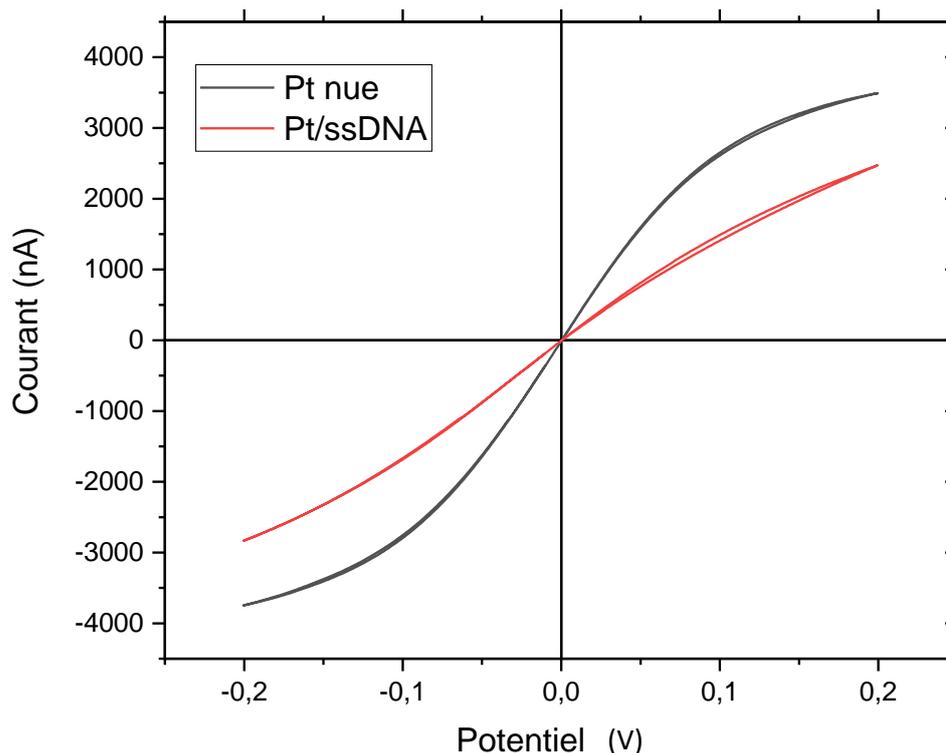


Figure 6. 20 Voltammogrammes obtenus en microfluidique, dans une solution de ferri / ferrocyanure 20 mM et $\text{NaCl } 0,5 \text{ M}$ (courbe noire), après immobilisation de la séquence d'ADN sonde avec TCEP à 5 mM (courbe rouge).

Il apparaît clairement que la densité du courant diminue après chaque modification de surface indiquant l'immobilisation de ces espèces chimiques à la surface de l'électrode. Cette diminution est causée par le ralentissement du transfert d'électrons lié à l'effet de l'augmentation de l'épaisseur des couches greffées à la surface de l'électrode.

Nous avons suivi la détection de l'ADN cible toujours grâce à la voltammétrie cyclique en faisant varier, par additions successives, la concentration de la solution d'ADN complémentaire (figure 6.21). Chaque greffage successif se traduit par la diminution de la densité du courant du signal rédox après chaque augmentation de la concentration qui

correspond à une augmentation du nombre de brins d'ADN hybridés. Cette diminution du signal rédox confirme la bonne hybridation d'ADN.

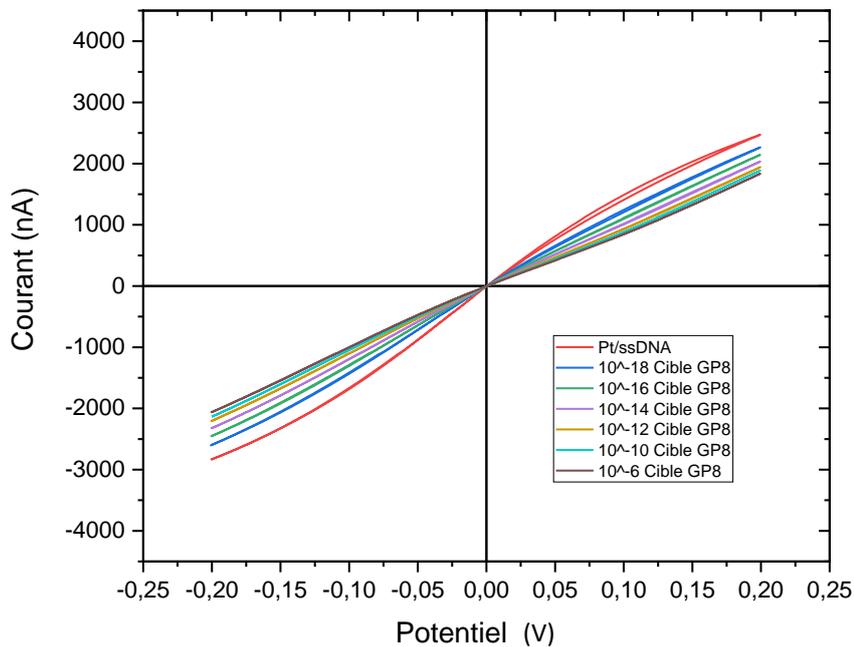


Figure 6. 21 Suivi de l'hybridation de l'ADN par Voltammétrie Cyclique.

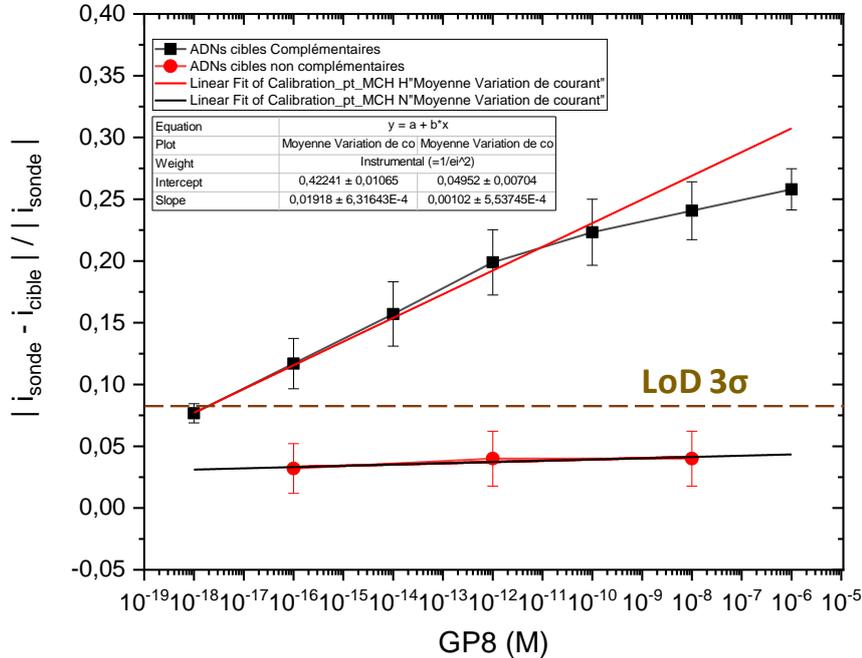


Figure 6. 22 Courbe de calibration d'une séquence cible complémentaire à la séquence sonde Gp8 (courbe noire) comparée au courbe de calibration pour une séquence cible Gp2 non-complémentaire de la sonde (courbe rouge). Chaque point correspond à 4 mesures.

Par ailleurs, puisqu'il est crucial de vérifier la fiabilité de notre biocapteur au niveau de la spécificité, nous avons également suivi la détection des brins NC (non complémentaires). Nous avons testé trois concentrations d'ADNs cibles différentes : 10^{-16}M , 10^{-12}M et 10^{-8}M . Les résultats sont présentés dans la figure 6.22. La courbe de calibration de l'hybridation des brins NC reste stable dans le bruit de fond, cela confirme qu'aucune hybridation entre la sonde et la cible NC se produit.

En utilisant deux méthodes d'immobilisation d'ADN différentes, nous avons pu détecter une concentration d'ADN complémentaire en seulement 30 minutes, avec une limite de détection de 10^{-16}M .

Conclusions et perspectives

Mes travaux de thèse ont porté sur le développement d'une plateforme microfluidique qui va permettre d'accélérer le diagnostic de la septicémie. Afin d'atteindre ce but, nous avons développé quatre modules microfluidiques indépendants permettant : 1/ de lyser les entités du sang (**module de lyse**), 2/ d'extraire les agents pathogènes présents dans le lysat par tri inertiel (**module de tri**), 3/ de lyser et trier en même temps (**module intégré**) et 4/ de réaliser une analyse génomique d'ADN extrait des bactéries, avec identification moléculaire par détection électrochimique sensible et directe sans amplification PCR (**module de détection électrochimique**).

Pour le module de lyse, nous avons tout d'abord optimisé un protocole de lyse complète du sang contenant des bactéries à l'échelle macroscopique. Ce protocole vise à lyser d'une manière sélective la totalité des cellules sanguines au moyen d'un traitement par la saponine à 1% m/v associé à un choc osmotique (volumes sang : saponine : eau valant 1 :1 :2) tout en maintenant viables les bactéries de manière à les extraire sans les endommager.

Après avoir étudié la lyse des cellules sanguines à l'échelle macroscopique, nous avons transféré ce protocole dans une puce microfluidique. Plusieurs géométries de circuits microfluidiques permettant le mélange des différents fluides et réactifs ont été conçues afin de choisir la meilleure. Nous avons également réussi à lyser les cellules sanguines en mélangeant dans une puce microfluidique (à l'échelle microscopique) le sang avec une solution de saponine à 1 % m/v et de l'eau déionisée. Le protocole de lyse appliqué permet de récupérer à la sortie de la puce une solution de lysat contenant la totalité des bactéries viables. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de Zelenin [8]. Notre plateforme microfluidique a été optimisée pour fonctionner à un débit élevé d'environ 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, ce qui réduit le temps de traitement par un facteur 3 par rapport au dispositif de Zelenin (48 $\mu\text{L}/\text{min}$) [8]. Elle permet le traitement d'un grand volume de sang en peu de temps, à savoir 20 mL en 2 heures. Ce protocole pourrait également être facilement transféré à un industriel pour le développement d'un véritable dispositif médical, facile à manipuler par le clinicien. En comparant le résultat de la lyse à l'échelle macroscopique et microscopique, nous remarquons que la lyse microscopique est 5 fois plus efficace que la lyse macroscopique (le pourcentage de cellules sanguines survivantes après la lyse dans la puce est 0.02% au lieu de 0.1%).

Concernant **le module de tri**, dédié à trier les bactéries parmi les débris sanguins, nous avons choisi comme stratégie de concevoir un dispositif permettant de séparer les bactéries des

débris sanguins en utilisant la microfluidique inertielle. Le module de tri utilisé dans nos expériences est un simple canal en serpentin composé d'une entrée et de deux sorties : une sortie centrale (sortie #1) et une sortie latérale (sortie #2). Dans ma thèse, nous avons testé deux hauteurs de canal différentes : 1) *design 1* avec $h = 40 \mu\text{m}$ (similaire à celle de Zhang [66]) et 2) *design 2* avec $h = 20 \mu\text{m}$. Nous avons effectué des tests de tri avec des petites particules de 2 et de 5 μm pour mimer les bactéries que l'on cherche à isoler et des grosses particules ($\sim 15 \mu\text{m}$) pour représenter les amas de débris sanguins.

Avec le *design 1* ($h = 40 \mu\text{m}$), nous avons réussi à trier avec un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ les particules de 5 et de 15 μm avec une très haute sélectivité permettant d'atteindre une pureté de 99,9 % pour les grosses particules de 15 μm dans la sortie 1 et une pureté de 98,9 % pour les petites particules de 5 μm dans la sortie 2 (canaux latéraux). Concernant les petites particules de 2 μm et les bactéries, le design proposé est capable de trier 63 % des particules et 59% des bactéries.

Avec le *design 2* ($h = 20 \mu\text{m}$), pour un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, nous avons réussi à trier les petites particules de 2 μm avec une pureté de 87,8 % dans la sortie 2. Concernant les bactéries, nous avons également réussi à collecter 65% dans la sortie 2.

Les bactéries ne sont pas triées de la même façon que les particules. Ceci provient de la différence de géométrie entre une bactérie et une particule. Habituellement, une bactérie *E. Coli* a une forme bâtonnet, tandis que les particules utilisées dans mes tests ont une forme sphérique.

À propos du module intégré (lyse + tri ; module 1), nous avons utilisé dans la partie tri le *design 1* avec une hauteur de canal serpentin de 40 μm afin de diminuer la chute de pression due à la différence de hauteur entre les deux modules (lyse et tri). Nous avons réussi à lyser toutes cellules sanguines en triant les particules du lysat sanguin. Nous avons également réussi à trier les particules de 5 et de 15 μm avec une très haute pureté de ~ 99 % pour les grosses particules de 15 μm dans la sortie 1 et une pureté de ~ 95 % pour les petites particules de 5 μm dans la sortie 2 (canaux latéraux). En combinant deux techniques dans la même plateforme microfluidique, il s'agit donc de la première méthode de préparation d'échantillons qui réussit à trier les particules directement à partir du lysat sanguin.

Concernant le **module de détection électrochimique (module 2)** dédié à l'analyse d'ADN génomique extrait de la bactérie, nous avons mis en œuvre deux méthodes de greffage de sondes spécifiques de la résistance aux antibiotiques : 1) le greffage par voie électrochimique

et 2) le greffage par voie chimique (liaisons Pt-Thiols, toujours en cours d'optimisation). Par ces deux différentes voies, nous avons réussi à détecter, en 30 minutes, une concentration d'ADN complémentaire avec une limite de détection de 10^{-16} M. Dans ma thèse, je n'ai pas eu le temps de réaliser l'expérience qui consiste à récupérer le lysat bactérien pour ensuite aller l'injecter sur les électrodes fonctionnalisées avec les sondes complémentaires aux gènes de résistances aux antibiotiques. En conséquence, je n'ai travaillé qu'avec des ADN cibles synthétiques.

Il est important d'envisager les expériences importantes à mener en perspective pour la suite de cet axe de recherche. Les prochaines expériences devraient porter sur :

1/ la vérification de l'efficacité du protocole de la lyse sur du sang humain contenant des vraies souches bactériennes. Une expérience préliminaire, réalisée avec Hervé Jacquier à l'hôpital Henri Mondor, a montré que la lyse du sang humain complet est possible, mais les mesures en cytométrie de flux n'ont pas permis de conclure sur la viabilité des bactéries.

2/ il pourrait être intéressant de diminuer la hauteur du module de tri jusqu'à $10\ \mu\text{m}$ afin d'augmenter le rapport d'inertie R_f et de focaliser les bactéries à la sortie de la puce.

3/ aussi, de diminuer la hauteur du module de lyse afin de faciliter les procédures de fabrication du module intégré et minimiser la résistance fluïdique créée entre les deux modules de lyse et de tri.

4/ Effectuer des simulations comsol sur le module de tri et le module intégré serait également très intéressant.

5/ Enfin, il serait important de mettre en œuvre un protocole de lyse bactérienne sur puce afin d'extraire l'ADN avant d'injecter le lysat bactérien dans la puce de détection. Ce petit module de lyse bactérienne pourrait donc être intégré à la puce de détection à plus long terme.

6/ Une optimisation du protocole d'immobilisation par voie chimique devrait aussi permettre d'augmenter la spécificité et la sensibilité du capteur électrochimique. La détection avec des échantillons plus représentatifs du milieu biologique à partir de lysat bactérien reste à entreprendre.

Références

- [1] M. Singer *et al.*, “The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3),” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 315, no. 8, pp. 801–810, 2016, doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] S. Zelenin, J. Hansson, S. Ardabili, H. Ramachandraiah, H. Brismar, and A. Russom, “Microfluidic-based isolation of bacteria from whole blood for sepsis diagnostics,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, no. 4, pp. 825–830, 2015, doi: 10.1007/s10529-014-1734-8.
- [3] M. Goto and M. N. Al-Hasan, “Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 19, no. 6, pp. 501–509, 2013, doi: 10.1111/1469-0691.12195.
- [4] R. Ferrer *et al.*, “Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: Results from a guideline-based performance improvement program,” *Crit. Care Med.*, vol. 42, no. 8, pp. 1749–1755, 2014, doi: 10.1097/CCM.0000000000000330.
- [5] M. D. Zilberberg, A. F. Shorr, S. T. Micek, C. Vazquez-Guillamet, and M. H. Kollef, “Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: A retrospective cohort study,” *Crit. Care*, vol. 18, no. 6, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1186/s13054-014-0596-8.
- [6] E. B. To and H. A. L. Id, “Methodes physiques d ’ extraction de micro-organismes a partir d ’echantillons sanguins a l ’aide de microsystemes DE L ’ ECOLE N ORMALE SUPERIEURE DE CACHAN Présentée par Mlle BISCEGLIA Emilie pour obtenir le grade de Méthodes physiques d,” 2014.
- [7] J. Zhang, S. Yan, W. Li, G. Alici, and N. T. Nguyen, “High throughput extraction of plasma using a secondary flow-aided inertial microfluidic device,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 63, pp. 33149–33159, 2014, doi: 10.1039/c4ra06513a.
- [8] L. L. Southwood, “Practical Guide to Equine Colic,” *Practical Guide to Equine Colic*. 2013, doi: 10.1002/9781118704783.
- [9] M. Simeoni, “Modélisation numérique des formes d ’ équilibre d ’ un globule rouge,” vol. 6, no. December, 2016.
- [10] “Membrane (biologie) — Wikipédia.” .

- [11] “Microbiology Ch 2.” .
- [12] R. Whittaker, “Structure et physiologie de la bactérie,” *Cours sur la bactérie*, 1800.
- [13] A. Wicaksana, *ATLAS DE POCHE DE MICROBIOLOGIE*. 2016.
- [14] W. Lee, P. Tseng, and D. Di Carlo, *Microtechnology for Cell Manipulation and Sorting*. 2017.
- [15] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, 2005, doi: 10.1103/RevModPhys.77.977.
- [16] T. M. Squires, R. J. Messinger, and S. R. Manalis, “Making it stick: Convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 4, pp. 417–426, 2008, doi: 10.1038/nbt1388.
- [17] M. L. Y. Sin, J. Gao, J. C. Liao, and P. K. Wong, “System Integration - A Major Step toward Lab on a Chip,” *J. Biol. Eng.*, vol. 5, no. May, 2011, doi: 10.1186/1754-1611-5-6.
- [18] A. Orfao and A. Ruiz-Argüelles, “General concepts about cell sorting techniques,” *Clin. Biochem.*, vol. 29, no. 1, pp. 5–9, 1996, doi: 10.1016/0009-9120(95)02017-9.
- [19] M. Almeida, A. C. García-Montero, and A. Orfao, “Cell purification: A new challenge for biobanks,” *Pathobiology*, vol. 81, pp. 261–275, 2014, doi: 10.1159/000358306.
- [20] A. J. Strelkauskas, M. Teodorescu, and S. Dray, “Enumeration and isolation of human T and B lymphocytes by rosette formation with antibody coated erythrocytes,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 22, no. 1, pp. 62–71, 1975.
- [21] M. J. G. J. W. Bois *et al.*, “Paediatric Rheumatology Workshop / Series Editor : P . Woo The depletion of T cells from haematopoietic stem cell transplants,” pp. 751–754, 1999.
- [22] L. D’Amico, N. J. Ajami, J. A. Adachi, P. R. C. Gascoyne, and J. F. Petrosino, “Isolation and concentration of bacteria from blood using microfluidic membraneless dialysis and dielectrophoresis,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 7, pp. 1340–1348, 2017, doi: 10.1039/c6lc01277a.
- [23] K. Nagase *et al.*, “Dynamically cell separating thermo-functional biointerfaces with densely packed polymer brushes,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 37, pp. 19514–19522, 2012, doi: 10.1039/c2jm31797d.
- [24] T. F. Didar and M. Tabrizian, “Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 22, pp. 3043–3053, 2010, doi:

- 10.1039/c0lc00130a.
- [25] S. M. Devine, H. M. Lazarus, and S. G. Emerson, "Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: Current status and future prospects," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 31, no. 4, pp. 241–252, 2003, doi: 10.1038/sj.bmt.1703813.
- [26] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch, "High gradient magnetic cell separation with MACS," *Cytometry*, vol. 11, no. 2, pp. 231–238, 1990, doi: 10.1002/cyto.990110203.
- [27] Z. Bacem, "Détection électrochimique en puce microfluidique: importance des transducteurs nanocarbonés.," *THÈSE Dr.*, 2016.
- [28] H. Bruus, "Lecture Notes Theoretical microfluidics," *Physics (College Park, Md.)*, vol. 18, no. 33235, p. 363, 2008.
- [29] S. Laurette, R. Dufour, F. Brendriaa, V. Thomy, and N.-E. Bourzgui, "Physique des fluides aux échelles microscopiques pour l'ingénierie des microsystèmes: l'apprentissage par la simulation," *J3eA*, vol. 10, p. 0001, 2011, doi: 10.1051/j3ea/2011013.
- [30] J. Zhang, "Particle inertial focusing and separation in serpentine microchannels: mechanisms and applications," *Univ. Wollongong Thesis Collect. 1954-2016*, 2015, [Online]. Available: <http://ro.uow.edu.au/theses/4492>.
- [31] O. Français and H. Horsin Molinaro, "La microfluidique : principes physiques et mise en œuvre d'écoulements continus," no. figure 2, pp. 1–10, 2016.
- [32] S. Narayana Iyengar, J. Dietvorst, A. Ferrer-Vilanova, G. Guirado, X. Muñoz-Berbel, and A. Russom, "Toward Rapid Detection of Viable Bacteria in Whole Blood for Early Sepsis Diagnostics and Susceptibility Testing," *ACS Sensors*, 2021, doi: 10.1021/acssensors.1c01219.
- [33] K. C. Tjandra *et al.*, "Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing," *Antibiotics*, vol. 11, no. 4, 2022, doi: 10.3390/antibiotics11040511.
- [34] Y. Ai, C. K. Sanders, and B. L. Marrone, "Separation of escherichia coli bacteria from peripheral blood mononuclear cells using standing surface acoustic waves," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 19, pp. 9126–9134, 2013, doi: 10.1021/ac4017715.
- [35] P. Ohlsson, K. Petersson, P. Augustsson, and T. Laurell, "Acoustic impedance matched buffers enable separation of bacteria from blood cells at high cell concentrations," *Sci. Rep.*, vol. 8, no.

- 1, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25551-0.
- [36] R. S. Kuczenski, H. C. Chang, and A. Revzin, “Dielectrophoretic microfluidic device for the continuous sorting of *Escherichia coli* from blood cells,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, 2011, doi: 10.1063/1.3608135.
- [37] J. Gao, M. L. Y. Sin, T. Liu, V. Gau, J. C. Liao, and P. K. Wong, “Hybrid electrokinetic manipulation in high-conductivity media,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 10, pp. 1770–1775, 2011, doi: 10.1039/c1lc20054b.
- [38] E. Bisceglia *et al.*, “A generic and label free method based on dielectrophoresis for the continuous separation of microorganism from whole blood samples,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 212, pp. 335–343, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2015.02.024.
- [39] S. H. Jung *et al.*, “Advection Flows-Enhanced Magnetic Separation for High-Throughput Bacteria Separation from Undiluted Whole Blood,” *Small*, vol. 14, no. 34, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1002/smll.201801731.
- [40] Y. L. Fang *et al.*, “An integrated microfluidic system for early detection of sepsis-inducing bacteria,” *Lab Chip*, vol. 21, no. 1, pp. 113–121, 2021, doi: 10.1039/d0lc00966k.
- [41] G. S. and A. Silberberg, “Radial particle displacements in poiseuille flow of suspensions,” *Radial Part. Displac. poiseuille flow Suspens.*, 1961.
- [42] S. H. Yang, D. J. Lee, J. R. Youn, and Y. S. Song, “Multiple-Line Particle Focusing under Viscoelastic Flow in a Microfluidic Device,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 6, pp. 3639–3647, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b05052.
- [43] D. Di Carlo, “Inertial microfluidics,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 21, pp. 3038–3046, 2009, doi: 10.1039/b912547g.
- [44] J. Zhou and I. Papautsky, “Fundamentals of inertial focusing in microchannels,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 6, pp. 1121–1132, 2013, doi: 10.1039/c2lc41248a.
- [45] Y. Gao, “Inertial migration of particles in microchannel flows Yanfeng Gao To cite this version : HAL Id : tel-01630993,” no. June, 2019.
- [46] P. G. Saffman, “The lift on a small sphere in a slow shear flow,” *J. Fluid Mech.*, vol. 22, no. 2, pp. 385–400, 1965, doi: 10.1017/S0022112065000824.
- [47] T. Gerlach, “[() I,” 1998.

- [48] J. Feng, D. D. Joseph, and H. H. Hu, "Direct simulation of initial value problems for the motion of solid bodies in a Newtonian fluid. part 2. Couette and Poiseuille flows," *J. Fluid Mech.*, vol. 277, pp. 271–301, 1994, doi: 10.1017/S0022112094002764.
- [49] J. M. Martel and M. Toner, "Inertial focusing in microfluidics," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 16, pp. 371–396, 2014, doi: 10.1146/annurev-bioeng-121813-120704.
- [50] L. Zeng, F. Najjar, S. Balachandar, and P. Fischer, "Forces on a finite-sized particle located close to a wall in a linear shear flow," *Phys. Fluids*, vol. 21, no. 3, 2009, doi: 10.1063/1.3082232.
- [51] D. Di Carlo, J. F. Edd, K. J. Humphry, H. A. Stone, and M. Toner, "Particle segregation and dynamics in confined flows," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 102, no. 9, 2009, doi: 10.1103/PhysRevLett.102.094503.
- [52] J. P. Matas, J. F. Morris, and É. Guazzelli, "Inertial migration of rigid spherical particles in Poiseuille flow," *J. Fluid Mech.*, vol. 515, pp. 171–195, 2004, doi: 10.1017/S0022112004000254.
- [53] S. I. Rubinow and J. B. Keller, "The transverse force on a spinning sphere moving in a viscous fluid," *J. Fluid Mech.*, vol. 11, no. 3, pp. 447–459, 1961, doi: 10.1017/S0022112061000640.
- [54] H. Development Bureau, "Legislative Council Brief - Measures to Foster a Quality and Sustainable Built Environment," *Practice*, vol. 381, pp. 63–87, 2010.
- [55] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 48, pp. 18892–18897, 2007, doi: 10.1073/pnas.0704958104.
- [56] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, and I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle filtration and extraction," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 7, no. 2, pp. 217–226, 2009, doi: 10.1007/s10404-008-0377-2.
- [57] A. J. Chung, "A Minireview on Inertial Microfluidics Fundamentals: Inertial Particle Focusing and Secondary Flow," *Biochip J.*, vol. 13, no. 1, pp. 53–63, 2019, doi: 10.1007/s13206-019-3110-1.
- [58] J. M. Martel and M. Toner, "Particle focusing in curved microfluidic channels," *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1038/srep03340.
- [59] F. T. Smith, "Pulsatile flow in curved pipes," *J. Fluid Mech.*, vol. 71, no. 1, pp. 15–42, 1975, doi: 10.1017/S0022112075002418.
- [60] J. Zhang *et al.*, "Fundamentals and applications of inertial microfluidics: A review," *Lab Chip*,

- vol. 16, no. 1, pp. 10–34, 2016, doi: 10.1039/c5lc01159k.
- [61] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, N. Kaval, C. J. Seliskar, and I. Papautsky, “Inertial microfluidics for sheath-less high-throughput flow cytometry,” *Biomed. Microdevices*, vol. 12, no. 2, pp. 187–195, 2010, doi: 10.1007/s10544-009-9374-9.
- [62] E. W. M. Kemna, R. M. Schoeman, F. Wolbers, I. Vermes, D. A. Weitz, and A. Van Den Berg, “High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 16, pp. 2881–2887, 2012, doi: 10.1039/c2lc00013j.
- [63] J. Zhang *et al.*, “Fundamentals of differential particle inertial focusing in symmetric sinusoidal microchannels,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 6, pp. 4077–4084, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b05712.
- [64] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, and I. Papautsky, “Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration,” *Lab Chip*, vol. 8, no. 11, pp. 1906–1914, 2008, doi: 10.1039/b807107a.
- [65] A. J. MacH, J. H. Kim, A. Arshi, S. C. Hur, and D. Di Carlo, “Automated cellular sample preparation using a Centrifuge-on-a-Chip,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 17, pp. 2827–2834, 2011, doi: 10.1039/c1lc20330d.
- [66] J. Zhang, W. Li, M. Li, G. Alici, and N. T. Nguyen, “Particle inertial focusing and its mechanism in a serpentine microchannel,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, no. 2, pp. 305–316, 2013, doi: 10.1007/s10404-013-1306-6.
- [67] J. Zhang, S. Yan, R. Sluyter, W. Li, G. Alici, and N. T. Nguyen, “Inertial particle separation by differential equilibrium positions in a symmetrical serpentine micro-channel,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. ii, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1038/srep04527.
- [68] H. Amini, W. Lee, and D. Di Carlo, “Inertial microfluidic physics,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 15, pp. 2739–2761, 2014, doi: 10.1039/c4lc00128a.
- [69] X. Lu *et al.*, “Sheathless and high-throughput elasto-inertial bacterial sorting for enhancing molecular diagnosis of bloodstream infection,” *Lab Chip*, vol. 21, no. 11, pp. 2163–2177, 2021, doi: 10.1039/d1lc00085c.
- [70] E. J. Lim *et al.*, “Inertio-elastic focusing of bioparticles in microchannels at high throughput,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. May, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1038/ncomms5120.

- [71] M. A. Faridi, H. Ramachandraiah, I. Banerjee, S. Ardabili, S. Zelenin, and A. Russom, "Elasto-inertial microfluidics for bacteria separation from whole blood for sepsis diagnostics," *J. Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1186/s12951-016-0235-4.
- [72] S. Narayana Iyengar, T. Kumar, G. Mårtensson, and A. Russom, "High resolution and rapid separation of bacteria from blood using elasto-inertial microfluidics," *Electrophoresis*, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1002/elps.202100140.
- [73] H. Wei Hou, H. Y. Gan, A. A. S. Bhagat, L. D. Li, C. T. Lim, and J. Han, "A microfluidics approach towards high-throughput pathogen removal from blood using margination," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 2, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1063/1.4710992.
- [74] D. Yuan *et al.*, "Dean-flow-coupled elasto-inertial particle and cell focusing in symmetric serpentine microchannels," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 23, no. 3, p. 0, 2019, doi: 10.1007/s10404-019-2204-3.
- [75] X. Lu, J. J. M. Chow, S. H. Koo, T. Y. Tan, B. Jiang, and Y. Ai, "Enhanced Molecular Diagnosis of Bloodstream Candida Infection with Size-Based Inertial Sorting at Submicron Resolution," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 23, pp. 15579–15586, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c03718.
- [76] P. Rodriguez-Mateos, B. Ngamsom, C. E. Dyer, A. Iles, and N. Pamme, "Inertial focusing of microparticles, bacteria, and blood in serpentine glass channels," *Electrophoresis*, vol. 42, no. 21–22, pp. 2246–2255, 2021, doi: 10.1002/elps.202100083.
- [77] M. Rafeie, J. Zhang, M. Asadnia, W. Li, and M. E. Warkiani, "Multiplexing slanted spiral microchannels for ultra-fast blood plasma separation," *Lab Chip*, vol. 16, no. 15, pp. 2791–2802, 2016, doi: 10.1039/c6lc00713a.
- [78] S. Böttger, K. Hofmann, and M. F. Melzig, "Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation?," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 20, no. 9, pp. 2822–2828, 2012, doi: 10.1016/j.bmc.2012.03.032.
- [79] S. Shany, A. W. Bernheimer, P. S. Grushoff, and K. S. Kim, "Evidence for membrane cholesterol as the common binding site for cereolysin, streptolysin O and saponin," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 3, no. 3, pp. 179–186, 1974, doi: 10.1007/BF01686643.
- [80] J. T. Dodge, C. Mitchell, and D. J. Hanahan, "The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 100, no. 1, pp. 119–130, 1963, doi: 10.1016/0003-9861(63)90042-0.

- [81] S. Schreier, S. V. P. Malheiros, and E. De Paula, "Surface active drugs: Self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1508, no. 1–2, pp. 210–234, 2000, doi: 10.1016/S0304-4157(00)00012-5.
- [82] R. M. Garavito and S. Ferguson-Miller, "Detergents as Tools in Membrane Biochemistry," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 35, pp. 32403–32406, 2001, doi: 10.1074/jbc.R100031200.
- [83] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry," *J. Chem. Educ.*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [84] I. H. Cho, D. H. Kim, and S. Park, "Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis," *Biomater. Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1186/s40824-019-0181-y.
- [85] F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, and R. Méallet-Renault, "Electrochimie, des concepts aux applications," *Sci. Sup Chim.*, p. 418, 2005, [Online]. Available: <http://www.dunod.com/pages/ouvrages/ficheouvrage.asp?id=47088>.
- [86] L. Zhang, B. Ding, Q. Chen, Q. Feng, L. Lin, and J. Sun, "Point-of-care-testing of nucleic acids by microfluidics," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 94, pp. 106–116, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.07.013.
- [87] S. Choi, M. Goryll, L. Y. M. Sin, P. K. Wong, and J. Chae, "Microfluidic-based biosensors toward point-of-care detection of nucleic acids and proteins," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 10, no. 2, pp. 231–247, 2011, doi: 10.1007/s10404-010-0638-8.
- [88] A. Liu *et al.*, "Development of electrochemical DNA biosensors," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 37, pp. 101–111, 2012, doi: 10.1016/j.trac.2012.03.008.
- [89] N. G. Clack, K. Salaita, and J. T. Groves, "Electrostatic readout of DNA microarrays with charged microspheres," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 825–830, 2008, doi: 10.1038/nbt1416.
- [90] Q. Wu, Y. Zhang, Q. Yang, N. Yuan, and W. Zhang, "Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 22, 2019, doi: 10.3390/s19224916.
- [91] J. I. A. Rashid and N. A. Yusof, "The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review," *Sens. Bio-Sensing*

- Res.*, vol. 16, no. September, pp. 19–31, 2017, doi: 10.1016/j.sbsr.2017.09.001.
- [92] S. Liu, Z. Zheng, and X. Li, “Advances in pesticide biosensors: Current status, challenges, and future perspectives,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 1, pp. 63–90, 2013, doi: 10.1007/s00216-012-6299-6.
- [93] T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton, “Electrochemical DNA sensors,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1192–1199, 2003, doi: 10.1038/nbt873.
- [94] T. E. Keyes and R. J. Forster, *Spectroelectrochemistry*. 2007.
- [95] J. I. A. Rashid and N. A. Yusof, “The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review,” *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 16, pp. 19–31, 2017, doi: 10.1016/j.sbsr.2017.09.001.
- [96] V. Velusamy, K. Arshak, C. F. Yang, L. Yu, O. Korostynska, and C. Adley, “Comparison between DNA Immobilization Techniques on a Redox Polymer Matrix,” *Am. J. Anal. Chem.*, vol. 02, no. 03, pp. 392–400, 2011, doi: 10.4236/ajac.2011.23048.
- [97] M. Amouzadeh Tabrizi and M. Shamsipur, “A label-free electrochemical DNA biosensor based on covalent immobilization of salmonella DNA sequences on the nanoporous glassy carbon electrode,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 69, pp. 100–105, 2015, doi: 10.1016/j.bios.2015.02.024.
- [98] M. C. Horny *et al.*, “Electrochemical DNA biosensors based on long-range electron transfer: Investigating the efficiency of a fluidic channel microelectrode compared to an ultramicroelectrode in a two-electrode setup,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 22, pp. 4373–4381, 2016, doi: 10.1039/c6lc00869k.
- [99] C. Poujouly *et al.*, “Microfluidic Chip for the Electrochemical Detection of MicroRNAs: Methylene Blue Increasing the Specificity of the Biosensor,” *Front. Chem.*, vol. 10, no. March, pp. 1–8, 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.868909.
- [100] Z. Izadi, M. Sheikh-Zeinoddin, A. A. Ensafi, and S. Soleimanian-Zad, “Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 80, pp. 582–589, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2016.02.032.
- [101] E. Sheikhzadeh, M. Chamsaz, A. P. F. Turner, E. W. H. Jager, and V. Beni, “Label-free impedimetric biosensor for *Salmonella Typhimurium* detection based on poly [pyrrole-co-3-carboxyl-pyrrole] copolymer supported aptamer,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 80, pp. 194–200, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2016.01.057.

- [102] KayakuAM, "SU-8 2000 Permanent Negative Epoxy Photoresist," *Kayak. Adv. Mater. Inc.*, pp. 1–6, 2020.
- [103] D. SU8-3000, "SU-8 3000 Permanent Epoxy Negative Photoresist," *Prod. Datasheet*, vol. 20, 2000.
- [104] D. SU8-2000, "Su-8 2025-75," *2025, 2035, 2050, 2075*, pp. 1–5, 2006, [Online]. Available: papers3://publication/uuid/E7A575F7-4BEF-4981-8E02-277673CABC12.
- [105] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 23, pp. 4974–4984, 1998, doi: 10.1021/ac980656z.
- [106] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft lithography," *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 153–184, 1998, doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.153.
- [107] J. C. McDonald *et al.*, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Electrophoresis*, vol. 21, no. 1, pp. 27–40, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C.
- [108] D. J. Campbell *et al.*, "Lisensky1999," vol. 75, no. 4, pp. 537–541, 1999.
- [109] A. C. C. Esteves *et al.*, "Influence of cross-linker concentration on the cross-linking of PDMS and the network structures formed," *Polymer (Guildf)*, vol. 50, no. 16, pp. 3955–3966, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.06.022.
- [110] M. Liu, J. Sun, Y. Sun, C. Bock, and Q. Chen, "Thickness-dependent mechanical properties of polydimethylsiloxane membranes," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 19, no. 3, 2009, doi: 10.1088/0960-1317/19/3/035028.
- [111] J. Lachaux, Y. Chen, and A. Haghiri, "Un oxygénateur microfluidique intégré et compact , à haute efficacité de transfert de gaz," 2020.
- [112] E. Feltrin, L. U. Bordeaux, and E. Feltrin, "Surfaces PDMS structurées et / ou décorées par des nanoparticules : vers des propriétés optiques et de mouillage modulables To cite this version : HAL Id : tel-01424148 Surfaces PDMS structurées et / ou décorées par des Nanoparticules Vers des propriétés ," 2017.
- [113] J. Madre, "La cytométrie en flux," 2015.
- [114] S. Mitra and S. R. Dungan, "Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of Temperature,

- Salt, and pH on Solution Properties," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 5, pp. 1587–1595, 1997, doi: 10.1021/jf960349z.
- [115] F. Lang, K. S. Lang, P. A. Lang, S. M. Huber, and T. Wieder, "Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes," *Acta Physiol.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 191–198, 2006, doi: 10.1111/j.1748-1716.2006.01564.x.
- [116] C. Physiology, "Cellular Physiology Cellular Physiology," *Cell Physiol Biochem*, vol. 15, pp. 195–202, 2005, [Online]. Available: www.karger.com/journals/net.
- [117] M. S. Rahim, N. Selamat, J. Yunas, and A. A. Ehsan, "Effect of geometrical shapes on 3D hydrodynamic focusing of a microfluidic flow cytometer," pp. 113–116, 2016.
- [118] K. I. Belousov, N. A. Filatov, I. V. Kukhtevich, V. Kantsler, A. A. Evstrapov, and A. S. Bukatin, "An asymmetric flow-focusing droplet generator promotes rapid mixing of reagents," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-88174-y.
- [119] Z. Zhang, P. Zhao, G. Xiao, M. Lin, and X. Cao, "Focusing-enhanced mixing in microfluidic channels," *Biomicrofluidics*, vol. 2, no. 1, 2008, doi: 10.1063/1.2894313.
- [120] M. M. Prat, M. P. Tabeling, and M. M. Tatoulian, "Écoulements de fluides complexes en présence d'interfaces dans des systèmes microfluidiques To cite this version : Aurélien Duboin Écoulements de fluides complexes en présence d'interfaces dans des systèmes microfluidiques," 2013.
- [121] M. J. Simmonds, H. J. Meiselman, and O. K. Baskurt, "Blood rheology and aging," *J. Geriatr. Cardiol.*, vol. 10, no. 3, pp. 291–301, 2013, doi: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.03.010.
- [122] Claire poujouly, "Plateforme microfluidique pour la détection électrochimique multiplexée de microARNs du cancer, Thèse de Claire Poujouly," 2022.
- [123] M. Lazerges, V. T. Tal, P. Bigey, D. Scherman, and F. Bedioui, "Electrochemical DNA-biosensors: Two-electrode setup well adapted for miniaturized devices," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 182, pp. 510–513, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.02.098.
- [124] Mémoire C.MESNIL - vf_180617_Cambau, "Diagnostic moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez Escherichia coli responsable de sepsis grave," 2017.
- [125] A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Electrochemical methods, fundamentals and applications," vol. 60, no. 1, p. 1983, 1983.

- [126] N. Aristov and A. Habekost, "Cyclic Voltammetry - A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes," *World J. Chem. Educ. Vol. 3, 2015, Pages 115-119*, vol. 3, no. 5, pp. 115–119, 2015, doi: 10.12691/wjce-3-5-2.
- [127] S. Pinijsuwan, P. Rijiravanich, M. Somasundrum, and W. Surareungchai, "Sub-femtomolar electrochemical detection of DNA hybridization based on latex/gold nanoparticle-assisted signal amplification," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 17, pp. 6779–6784, 2008, doi: 10.1021/ac800566d.
- [128] P. Allongue and J. Pinson, "Fonctionnalisation organique de surface par électrogreffage: Méthodes et applications," *Actual. Chim.*, no. 327–328, pp. 98–103, 2009.
- [129] I. Gallardo, J. Pinson, and N. Vilà, "Spontaneous attachment of amines to carbon and metallic surfaces," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 39, pp. 19521–19529, 2006, doi: 10.1021/jp063368c.
- [130] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, and M. G. Hill, "Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 24, pp. 4830–4837, 1999, doi: 10.1093/nar/27.24.4830.
- [131] Z. Qing *et al.*, "Pt–S Bond-Mediated Nanoflakes for High-Fidelity Intracellular Applications by Avoiding Thiol Cleavage," *Angew. Chemie*, vol. 132, no. 33, pp. 14148–14152, 2020, doi: 10.1002/ange.202003964.
- [132] B. Yang and A. G. Agrios, "Attachment of Pt nanoparticles to a metal oxide surface using a thiol–carboxyl bifunctional molecule," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 513, pp. 464–469, 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2017.11.058.
- [133] M. H. Armbruster and J. B. Austin, "The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Mica," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, no. 2, pp. 467–475, 1938, doi: 10.1021/ja01269a066.
- [134] A. B. Steel, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, "Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 22, pp. 4670–4677, 1998, doi: 10.1021/ac980037q.
- [135] B. Sun *et al.*, "Covalent photochemical functionalization of amorphous carbon thin films for integrated real-time biosensing," *Langmuir*, vol. 22, no. 23, pp. 9598–9605, 2006, doi: 10.1021/la061749b.
- [136] Z. Lin, T. Strother, W. Cai, X. Cao, L. M. Smith, and R. J. Hamers, "DNA attachment and hybridization at the silicon (100) surface," *Langmuir*, vol. 18, no. 3, pp. 788–796, 2002, doi: 10.1021/la010892w.

- [137] W. Zhou, J. Ding, and J. Liu, "A platinum shell for ultraslow ligand exchange: unmodified DNA adsorbing more stably on platinum than thiol and dithiol on gold," *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 60, pp. 12084–12087, 2015, doi: 10.1039/c5cc04340a.
- [138] S. Lee, W. J. Kim, and M. Chung, "Enhanced electrochemical biosensing on gold electrodes with a ferri/ferrocyanide redox couple," *Analyst*, vol. 146, no. 17, pp. 5236–5244, 2021, doi: 10.1039/d1an00952d.
- [139] L. Bábellová, M. E. Sohová, A. Poturnayová, M. Buríková, J. Bizík, and T. Hianik, "Label-free Electrochemical Aptasensor for Jurkat Cells Detection as a Potential Diagnostic Tool for Leukemia," *Electroanalysis*, vol. 30, no. 7, pp. 1487–1495, 2018, doi: 10.1002/elan.201800091.

Annexes

Annexe 1

Nombre de dispositifs microfluidiques fabriqués au cours de cette thèse

Module de Lyse	Nombre
Design 1	9
Design 2	10
Design 3	11
Design 4	15
Design 5	13
Design 6	12
Design 7 (Géométrie optimale)	24

Module de tri	Nombre
Design 1 (h=40 μm)	43
Design 2 (h=20 μm)	35

Module intégré	Nombre
Lyse + tri	15

Module de détection électrochimique	Nombre
Puce de détection	60

Annexe 2

Calcul des résistances hydrauliques R_h dans le module intégré

Pour rappel :

La résistance hydraulique R_h caractérise la relation entre le débit Q (en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et la chute de pression ΔP (en Pa) le long de la longueur du canal, sous la forme d'une loi de Poiseuille :

$$R_h = \frac{\Delta P}{Q} \quad \text{Équation 39}$$

Cette résistance R_h peut s'écrire de la manière suivante [28] :

$$R_h = \frac{12\mu L}{1 - 0.63 \left(\frac{h}{w}\right)} \frac{1}{wh^3} \quad \text{Équation 40}$$

où μ est la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s), L est la longueur du canal (en m), h est la hauteur du canal (en m) et w est la largeur du canal (en m).

Cette annexe décrit la méthode de calcul pour déterminer la résistance hydraulique R_h et la chute de pression ΔP dans le dispositif. Nous décrivons dans un premier temps la méthode de calcul pour estimer la résistance hydraulique totale. Le schéma équivalent de notre circuit microfluidique dans le module intégré est représenté dans la figure A1 ci-dessous.

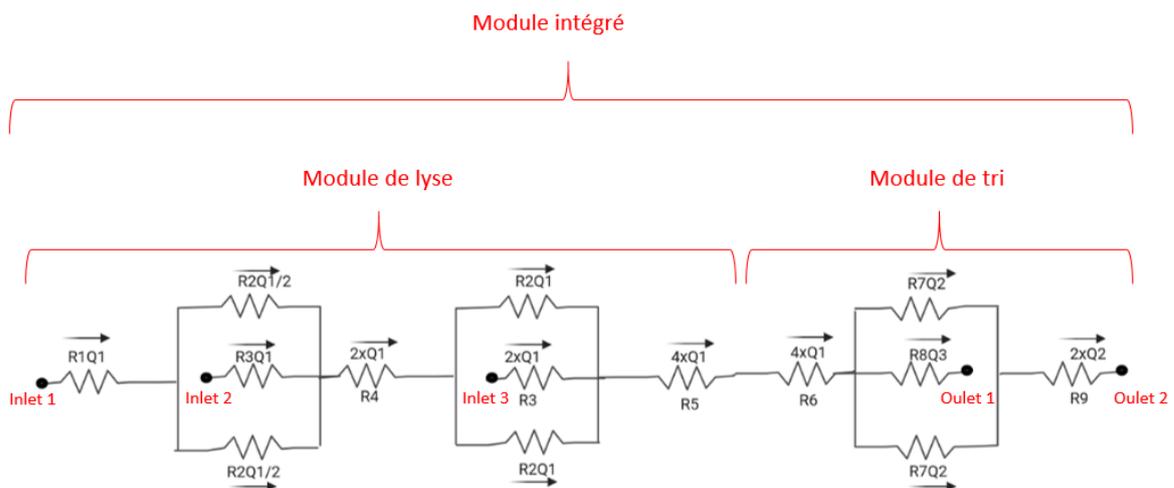


Figure A. 1 Schéma équivalent du circuit microfluidique

Paramètres :

Module de lyse :

- Hauteur du canal $h = 100 \mu\text{m} = 10 \times 10^{-5} \text{ m}$
- Largeur du canal : $w = 500 \mu\text{m} = 50 \times 10^{-5} \text{ m}$

Module de tri :

- Hauteur du canal $h = 40 \mu\text{m} = 4 \times 10^{-5} \text{ m}$
- Largeur du canal : $w = 200 \mu\text{m} = 20 \times 10^{-5} \text{ m}$

$$R_1 = 1,58 \times 10^{12} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_2 = 1,58 \times 10^{11} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_3 = 3,7 \times 10^{11} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_4 = 7,33 \times 10^{12} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_5 = 5,54 \times 10^{12} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_6 = 3,78 \times 10^{13} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_7 = 5,63 \times 10^{12} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_8 = 2,44 \times 10^{12} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

$$R_9 = 1,5 \times 10^{12} \text{ Pa.s.m}^{-3}$$

Annexe 3

Calcul du nombre de Reynolds Re dans le module de lyse et de triPour rappel :

Re est un nombre sans dimension, utilisé en mécanique des fluides pour caractériser le régime de l'écoulement, il permet de quantifier l'importance relative des forces visqueuses par rapport aux forces d'inertie.

$$Re = \frac{\text{Terme inertiel}}{\text{Terme visqueux}} = \frac{\rho_f v_f D_h}{\mu} \quad \text{Équation 41}$$

où v_f est la vitesse de l'écoulement (en m/s), ρ_f est la densité du fluide (en Kg.m^{-3}), μ est la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s) et D_h le diamètre hydraulique du canal qui est défini comme :

$$D_h = \frac{2wh}{w+h} \quad \text{Équation 42}$$

où w et h correspondent respectivement à la largeur et à la hauteur du canal.

Entrée du sang :

$$v_f = \frac{Q}{S} = \frac{2.5 * 10^{-9}}{100 * 10^{-6} * 500 * 10^{-6}} = 0.05 \text{ m.s}^{-1}$$

$$D_h = \frac{2\omega h}{\omega + h} = \frac{2 * 100 * 10^{-6} * 500 * 10^{-6}}{(100 + 500) * 10^{-6}} = 167 \mu\text{m}$$

$$Re = \frac{\rho_f v_f D_h}{\mu} = \frac{1.0 * 10^3 * 0.05 * 167 * 10^{-6}}{1.0 * 10^{-3}} = 8.4$$

Partie sang-saponine (circuit entre l'entrée de la saponine et l'entrée de l'eau) :

$$v_f = \frac{Q}{S} = \frac{5.0 * 10^{-9}}{100 * 10^{-6} * 500 * 10^{-6}} = 0.1 \text{ m.s}^{-1}$$

$$D_h = \frac{2\omega h}{\omega + h} = \frac{2 * 100 * 10^{-6} * 500 * 10^{-6}}{(100 + 500) * 10^{-6}} = 167 \mu m$$

$$Re = \frac{\rho_f v_f D_h}{\mu} = \frac{1.0 * 10^3 * 0.1 * 167 * 10^{-6}}{1.0 * 10^{-3}} = 17$$

Partie eau-sortie (circuit entre l'entrée de l'eau et la sortie de la puce) :

$$v_f = \frac{Q}{S} = \frac{1.00 * 10^{-8}}{100 * 10^{-6} * 500 * 10^{-6}} = 0.2 m.s^{-1}$$

$$D_h = \frac{2\omega h}{\omega + h} = \frac{2 * 100 * 10^{-6} * 500 * 10^{-6}}{(100 + 500) * 10^{-6}} = 167 \mu m$$

$$Re = \frac{\rho_f v_f D_h}{\mu} = \frac{1.0 * 10^3 * 0.2 * 167 * 10^{-6}}{1.0 * 10^{-3}} = 33$$

Module de tri (débit optimal : 600 μ L/min):

$$v_f = \frac{Q}{S} = \frac{1.00 * 10^{-8}}{40.0 * 10^{-6} * 200 * 10^{-6}} = 1.25 m.s^{-1}$$

$$D_h = \frac{2\omega h}{\omega + h} = \frac{2 * 40 * 10^{-6} * 200 * 10^{-6}}{(40 + 200) * 10^{-6}} = 67 \mu m$$

$$Re = \frac{\rho_f v_f D_h}{\mu} = \frac{1.0 * 10^3 * 1.25 * 67 * 10^{-6}}{1.0 * 10^{-3}} = 84$$

Caractéristique du module 1 (lyse et tri) :

Volume totale : 33 μL

Longueur totale : 60 cm

Le temps nécessaire pour remplir la puce : 6.5 s

Surface totale de la puce : $3,31 \times 10^8 \mu\text{m}^2$

Dimension = 4.5 cm x 4.5 cm

Annexe 4

Calculs du coefficient de diffusion D, du nombre de Pe, Du nombre de Dean et de la vitesse de flux secondaire U_D

Module de lyse :

Partie sang-saponine (circuit entre l'entrée de la saponine et l'entrée de l'eau) :

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu a} = \frac{1.38 * 10^{-23} * 293}{3 * \pi * 0.004 * 8 * 10^{-6}} = 1.34 * 10^{-14}$$

$$Pe = \frac{D_h v_f}{D} = \frac{167 * 10^{-6} * 0.1}{5.37 * 10^{-14}} = 1.25 * 10^9$$

Partie eau-sortie (circuit entre l'entrée de l'eau et la sortie de la puce) :

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu a} = \frac{1.38 * 10^{-23} * 293}{3 * \pi * 0.002 * 8 * 10^{-6}} = 2.68 * 10^{-14}$$

$$Pe = \frac{D_h v_f}{D} = \frac{167 * 10^{-6} * 0.1}{2.68 * 10^{-14}} = 6.23 * 10^8$$

Module de tri :

$$De = Re \sqrt{\frac{D_H}{2R}} = 84 * \sqrt{\frac{67 * 10^{-6}}{2 * 350 * 10^{-6}}} = 26$$

$$U_D = 1.8 * 10^{-4} * De^{1.63} = 1.8 * 10^{-4} * 28^{1.63} = 0.041 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

Annexe 5

La numération cellulaire

Principe :

La numération cellulaire permet de déterminer le nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. La cellule de Malassez est une cellule de numération qui possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm³. Chaque rectangle correspond à un volume de 0,01 µL (voir figure A.2).

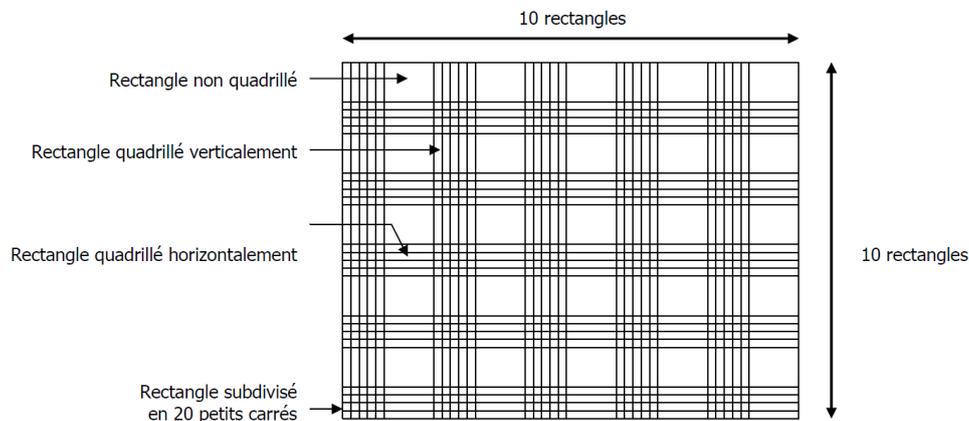


Figure A. 2 Quadrillage de 100 rectangles

Remplissage de la cellule de Malassez :

- Humecter (mettre une fine couche d'eau) les deux glissières latérales. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux glissières latérales : pour cela placer la lamelle sur ces glissières, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- Placer la cellule de Malassez sur une surface plane. Homogénéiser la suspension bactérienne au vortex et prélever 5 µL de la suspension à l'aide d'une micropipette. Remplir le quadrillage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plateforme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les bactéries sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage)

Numération :

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

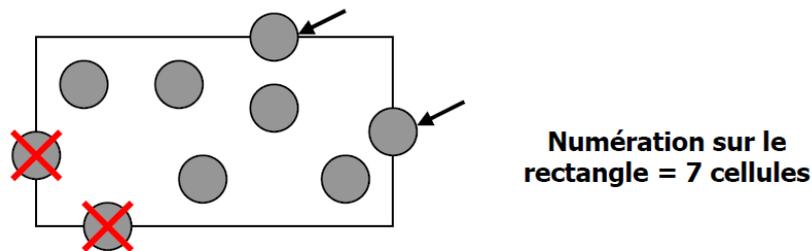


Figure A. 3 Numération sur un rectangle

Calcul de la concentration cellulaire :

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soient : **-n** : nombre de cellules comptées.

-V : volume de comptage.

-f : facteur de dilution.

-N : nombre de cellules par litres.

Si on a **n** cellules dans **V** litres, alors on a **N** cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1 \quad N = n / V$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Annexe 6

Tests fluidiques à différents débits, module de tri

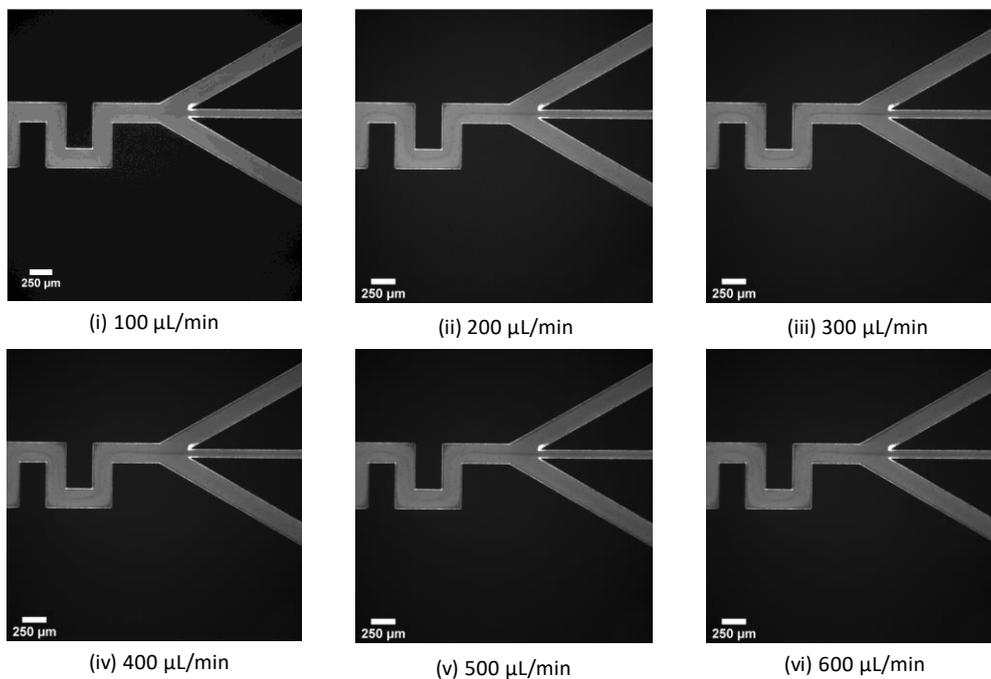


Figure A. 4 Tri des bactéries dans le design 1 ($h=40\ \mu\text{m}$).

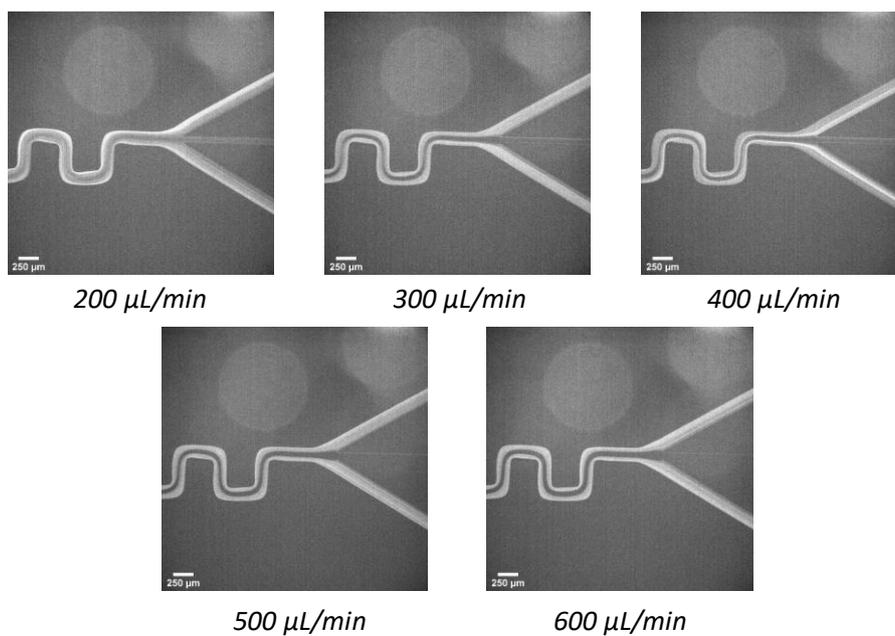


Figure A. 5 Tri des particules de $2\ \mu\text{m}$ dans le design 2 ($h=20\ \mu\text{m}$).

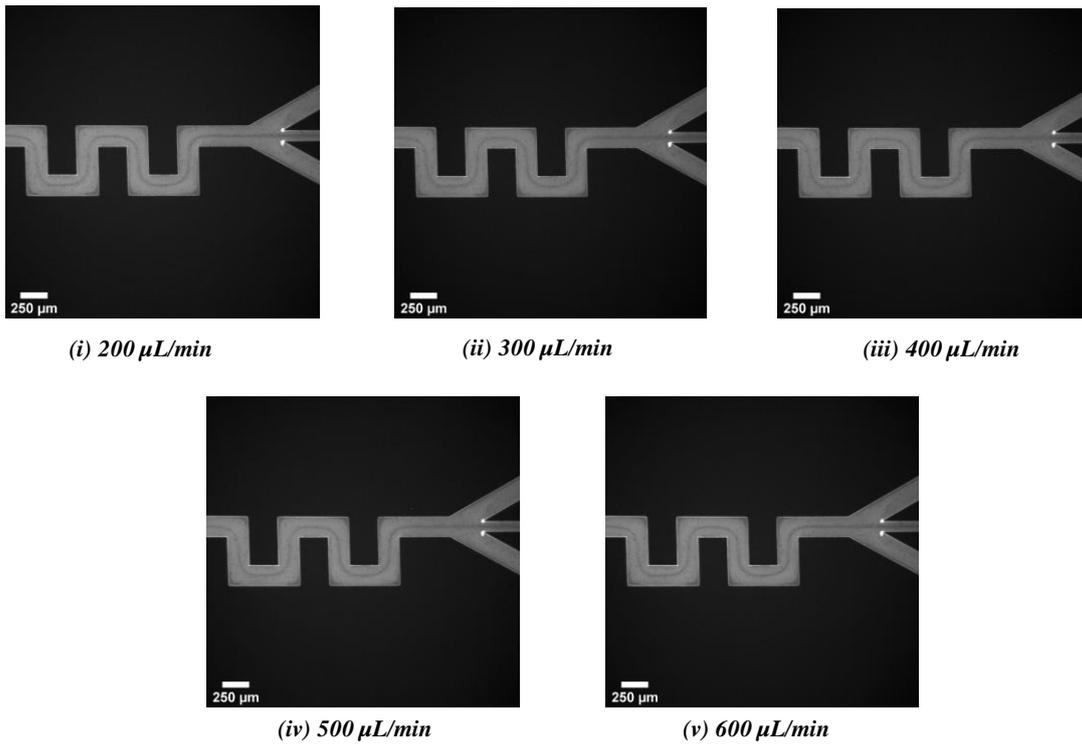


Figure A. 6 Tri des bactéries dans le design 2 ($h=20\ \mu\text{m}$)

Liste des illustrations

FIGURE 1. 1 ILLUSTRATIONS DE CELLULES SANGUINES OBSERVEES AU MICROSCOPE OPTIQUE ENTRE LAME ET LAMELLE (A) ET AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (B) [6]	16
FIGURE 1. 2 COMPOSITION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE. SCHEMA PROVENANT DE L'ARTICLE MEMBRANE (BIOLOGIE) DE WIKIPEDIA [10].	17
FIGURE 1. 3 A) SCHEMA D'UNE BACTERIE [6], B) STRUCTURE DES PAROIS BACTERIENNES GRAM + ET GRAM - [11].	17
FIGURE 1. 4 METHODE DE LYSE ET CENTRIFUGATION A L'ECHELLE MACROSCOPIQUE [22].	22
FIGURE 1. 5 ILLUSTRATION DU TYPE D'ECOULEMENT EN FONCTION DU NOMBRE DE REYNOLDS	27
FIGURE 1. 6 PROFIL DE VITESSE PARABOLIQUE (FLECHES BLEUES) [6]	28
FIGURE 1. 7 COUPLAGE EN SERIE DE DEUX CANAUX DE RESISTANCE HYDRAULIQUE R_{H1} ET R_{H2} . LA LOI D'ADDITIVITE DES RESISTANCES HYDRAULIQUES EST VALABLE DANS LA LIMITE DES NOMBRES DE REYNOLDS FAIBLES [28].	29
FIGURE 1. 8 COUPLAGE EN PARALLELE DE DEUX CANAUX DE RESISTANCE HYDRAULIQUE R_{H1} ET R_{H2} . LA LOI D'ADDITIVITE DES INVERSES DES RESISTANCES HYDRAULIQUES EST VALABLE DANS LA LIMITE DES NOMBRES DE REYNOLDS FAIBLES [28].	29
FIGURE 1. 9. (A) $Pe > 1$, CONVECTION DES 2 PRODUITS, (B) $Pe < 1$, CONVECTION ET DIFFUSION DES 2 PRODUITS [31].	31
FIGURE 1. 10 LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES AGENTS PATHOGENES [33].....	32
FIGURE 1. 11 SCHEMA DU TRI DE PARTICULES PAR ACOUSTOPHORESE POUR UN FLUIDE HETEROGENE [34]. ..	33
FIGURE 1. 12 DISCRIMINATION DES BACTERIES ET DES CELLULES SANGUINES HUMAINES VIA LA DIELECTROPHORESE [22].	34
FIGURE 1. 13 SCHEMA DU TRI DES BACTERIES DANS DU SANG PAR MAGNETOPHORESE [40].	35
FIGURE 1. 14 FOCALISATION INERTIELLE DE PARTICULES DANS UN CANAL CYLINDRIQUE, UN CANAL CARRE ET UN CANAL RECTANGULAIRE, RESPECTIVEMENT DE GAUCHE A DROITE SUR L'IMAGE [43].	37
FIGURE 1. 15 FORCE DE PORTANCE INDUITE PAR LA PAROI [45]	39
FIGURE 1. 16 FORCE DE PORTANCE INDUITE PAR LE CISAILLEMENT	40
FIGURE 1. 17 FORCE DE MAGNUS [45]	40
FIGURE 1. 18 LA VITESSE DE MIGRATION LATERALE U_L ET LA LONGUEUR MINIMALE DU CANAL POUR LA FOCALISATION DES PARTICULES L_{MIN} [30]	42
FIGURE 1. 19 SCHEMA DU FLUX SECONDAIRE [57]	43
FIGURE 1. 20 FORCE DE FLUX SECONDAIRE [45]	43
FIGURE 1. 21 FORCE CENTRIFUGE [66]	44
FIGURE 1. 22 L'EFFET DE LA FORCE CENTRIFUGE ET LA FORCE DE FLUX SECONDAIRE SUR LE TRAJECTOIRE DES PARTICULES	45
FIGURE 1. 23 (I) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA MIGRATION ET DE LA SEPARATION DE PARTICULES PAR MICROFLUIDIQUE ELASTO-INERTIELLE DANS UN ECOULEMENT A TRAVERS UN CANAL DROIT, DEVELOPPE PAR FARIDI ET AL. [71]. (II) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA SEPARATION DES PARTICULES EN FONCTION DE LEUR TAILLE A L'AIDE DE LA MICROFLUIDIQUE ELASTO-INERTIELLE DANS UN MICROCANAL EN SPIRAL, DEVELOPPE PAR IYENGAR ET AL. [32]. (III) DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE INERTIEL AVEC UNE ENTREE POUR L'INTRODUCTION D'ECHANTILLONS SANS GAIN ET DEUX SORTIES POUR LA COLLECTE DES DECHETS ET DES PRODUITS, DEVELOPPE PAR LU ET AL. [69]. (IV) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE DEVELOPPE POUR L'ELIMINATION DES AGENTS PATHOGENES DU SANG, DEVELOPPE PAR HOU ET AL. [73].	49
FIGURE 1. 24 (I) TRAJECTOIRES DE PARTICULES FLUORESCENTES CAPTUREES DANS LE MICROCANAL SERPENTIN SYMETRIQUE ET ASYMETRIQUE, DEVELOPPE PAR DI CARLO ET AL. [55]. (II) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU CONCEPT DE SEPARATION BASEE SUR LA TAILLE DES PARTICULES DANS UN CANAL EN SERPENTIN,	

DEVELOPPE PAR ZHANG ET AL. [67]. (III) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE L'EXTRACTION DU PLASMA DANS LE CANAL SERPENTIN, DEVELOPPE PAR ZHANG ET AL. [7]. (IV) VUE SCHEMATIQUE DE LA FOCALISATION ELASTO-INERTIELLE DES PARTICULES COUPLEES AU FLUX DE DEAN DANS LES CANAUX SERPENTINS, DEVELOPPE PAR YUAN ET AL. [74].....	52
FIGURE 1. 25 (I) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE DE TRI CELLULAIRE METTANT EN EVIDENCE LA REGION 1 COMME SITE D'ENTREE DU CANAL ET LA REGION 2 COMME SITE DE SORTIE DU CANAL. LES CELLULES DE CANDIDA (VERTES) SONT TRIEES DU MELANGE SANG-CANDIDA, ET LES CELLULES SANGUINES RESTANTES (ROUGES) SONT DES DECHETS [75]. (II) ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE DE TRI CELLULAIRE DANS DES CANAUX VERRE SERPENTINS COURBES GRAVES A DIFFERENTES PROFONDEURS [76].	52
FIGURE 1. 26 POURCENTAGE DES CELLULES SANGUINES ET DES BACTERIES VIABLES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SAPONINE (I) A L'ECHELLE MACRO ET (II) EN MICROFLUIDIQUE.....	54
FIGURE 1. 27 EVOLUTION DE LA FORME D'UN GLOBULE ROUGE EN FONCTION DE L'OSMOLARITE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE [6]	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 1. 28 MECANISMES DE SOLUBILISATION MEMBRANAIRE [81]	57
FIGURE 1. 29 DIAGRAMME SCHEMATIQUE DES BIOCAPTEURS ELECTROCHIMIQUES D'ADN [90].....	60
FIGURE 2. 1 ETAPES DE FABRICATION DES MOULES EN UTILISANT LA TECHNIQUE DE LA PHOTOLITHOGRAPHIE UV.....	65
FIGURE 2. 2 PHOTOGRAPHIES (A) DU MASQUE DE LYSE DU SANG CORRESPONDANT A LA GEOMETRIE DU DESIGN 7, DU MASQUE DE TRI CELLULAIRE (B) ET (C-D) LES MASQUES DU MODULE INTEGRE. ON PEUT OBSERVER QUE LES PARTIES TRANSPARENTES DES MASQUES CORRESPONDENT AUX MICROCANAUX MICROFLUIDIQUES.	67
FIGURE 2. 3 PHOTOGRAPHIES DES EQUIPEMENTS DE PHOTOLITHOGRAPHIE UTILISES AU COURS DE CETTE THESE : (A) L'EQUIPEMENT DE PHOTOLITHOGRAPHIE EVG 620 ET (B) L'EQUIPEMENT DE PHOTOLITHOGRAPHIE MJB4 DU C2N.....	68
FIGURE 2. 4 DESCRIPTION DU PROCESSUS DE FABRICATION DU MOULE MAITRE EN SI BASE SUR DEUX ETAPES DE LITHOGRAPHIE UV DANS UNE RESINE SU-8 POUR OBTENIR DEUX HAUTEURS (H) DIFFERENTES DANS LES DEUX MODULES FLUIDIQUES (H=40µM POUR LE MODULE DE TRI ET H=100µM POUR LE MODULE DE LYSE).	69
FIGURE 2. 5 PHOTOGRAPHIES DU MOULE REALISE AU MICROSCOPE OPTIQUE. ON PEUT VOIR QUE LES MICROCANAUX SONT BIEN DEFINIS ET QUE LA RESINE SU-8 ENTRE LES MOTIFS EST COMPLETEMENT ELIMINEE. A NOTER QUE LA HAUTEUR DES MOTIFS ICI N'EST PAS LA MEME.	70
FIGURE 2. 6. PHOTOGRAPHIES DU MOULE REALISE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	71
FIGURE 2. 7 PHOTOGRAPHIE D'UNE ANALYSE PAR PROFILOMETRIE MECANIQUE D'UN MOULE DE LYSE DONT LA HAUTEUR DES MOTIFS EST DE 100 µM ± 1 µM. LA PARTIE ENCADREE EN ROUGE MONTRE LA HAUTEUR MESUREE DES MOTIFS.....	71
FIGURE 2. 8. REACTION DE L'AGENT RETICULANT ET DU PRE-POLYMERE FORMANT LE PDMS [108].	73
FIGURE 2. 9. ETAPES DE FABRICATION D'UN MODULE MICROSTRUCTURE DE PDMS.	74
FIGURE 2. 10. LES DIFFERENTES ETAPES DU PROTOCOLE DE COLLAGE HUMIDE PDMS/HEXANE.....	74
FIGURE 2. 11. A GAUCHE (I), UNE PHOTO DU CAPOT EN PDMS « TAMPONNE » SUR LA COUCHE DE PDMS/HEXANE. A DROITE (II) UNE PHOTOGRAPHIE DU CAPOT EN PDMS MIS EN CONTACT AVEC LE FILM PDMS RETICULE FORMANT UNE STRUCTURE BICOUCHE. LES PHOTOGRAPHIES SONT PRISES SOUS HOTTE CAR L'HEXANE EST UN SOLVANT TOXIQUE.	75
FIGURE 2. 12. MECANISME D'OXYDATION DU PDMS ET FORMATION DE SILICE SIOH [112]	76
FIGURE 2. 13. (I) PHOTOGRAPHIE DE LA CHAMBRE PLASMA O ₂ . (II) PHOTOGRAPHIE DE DISPOSITIF FLUIDIQUE.	76
FIGURE 2. 14. LES DIFFERENTES ETAPES DE PHOTOLITHOGRAPHIE OPTIQUE	77

FIGURE 2. 15. PHOTOGRAPHIE DU MASQUE UTILISE POUR FABRIQUER LES ELECTRODES INTEGRES DANS LE MODULE DE LA DETECTION ELECTROCHIMIQUE.	79
FIGURE 2. 16. DEPOT METALLIQUE ET LIFT-OFF	79
FIGURE 2. 17. WAFER EN VERRE INTEGRANT LES ELECTRODES EN PLATINE	80
FIGURE 2. 18 MASQUE EN PLASTIQUE UTILISE POUR FABRIQUER LES CANAUX MICROFLUIDIQUE DU MODULE 2	80
FIGURE 2. 19. DISPOSITIFS COMPLETS AVEC LES CONNECTIQUES FLUIDIQUES A L'ENTREE ET AUX SORTIES DES FLUIDES. I) MODULE 1 : DEDIE A L'EXTRACTION DES BACTERIES DU SANG PERMETTANT LES DEUX ETAPES DE LYSÉ DU SANG PUIS DE TRI PAR MICROFLUIDIQUE INERTIELLE. II) MODULE 2 : DEDIE A LA DETECTION ELECTROCHIMIQUE.	81
FIGURE 3. 1 LA CIRCULATION DES FLUIDES DANS L'APPAREIL ET LE TRAJET DE LA LUMIERE [113].	83
FIGURE 3. 2 ANALYSE DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES : TAILLE ET GRANULARITE [113].....	84
FIGURE 3. 3 MATRICES REPRESENTANT LA COMPLEXITE INTERNE DE LA CELLULE EN FONCTION DE LEUR TAILLE CELLULAIRE. (I) SOLUTION SANGUINE TEMOIN. (II) SOLUTION SANGUINE ADDITIONNEE DE SAPONINE A 0,5%.....	84
FIGURE 3. 4 PROTOCOLES DE LA LYSÉ A L'ECHELLE MACROSCOPIQUE	85
FIGURE 3. 5 MATRICES OBTENUES POUR DEUX ECHANTILLONS SANGUINS : UN ECHANTILLON DE SANG TOTAL AVANT LA LYSÉ (I) ET UN ECHANTILLON DE SANG ADDITIONNE DE L'EAU DESIONISEE (II).	87
FIGURE 3. 6 MATRICES OBTENUES POUR DEUX ECHANTILLONS SANGUINS : UN ECHANTILLON DE SANG ADDITIONNE DE SAPONINE A 0.5% (I) ET UN ECHANTILLON DE SANG ADDITIONNE DE SAPONINE A 1% (II).	88
FIGURE 3. 7 MATRICES OBTENUES POUR DEUX ECHANTILLONS SANGUINS : EPPENDORF N°5 (I) ET EPPENDORF N°6 (II).	89
FIGURE 3. 8 MATRICE OBTENUE POUR UN ECHANTILLON DE SANG ADDITIONNE DE SAPONINE A 1 % (EPPENDORF N°7) ET ASSOCIE A UN CHOC OSMOTIQUE (EN AJOUTANT DE L'EAU (1 :1 :2))......	90
FIGURE 3. 9 POURCENTAGE DES CELLULES SANGUINES DANS LE LYSAT POUR CHAQUE EPPENDORF (I). COURBE DE LA LYSÉ CELLULAIRE POUR LE PROTOCOLE OPTIMAL (II).	90
FIGURE 3. 10 L'ECHANTILLON SANGUIN (I) AVANT ET (II) APRES LA LYSÉ (DILUTION AU 40 ^{EME} DES SOLUTIONS 1 ET 5).....	91
FIGURE 3. 11 METHODE D'ENSEMENCEMENT.....	93
FIGURE 3. 12 PREPARATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE	93
FIGURE 3. 13 PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE DE BACTERIES (ESCHERICHIA COLI) MARQUEES AVEC LE SYTO 9 ET L'IP.	94
FIGURE 3. 14 PROTOCOLE DE DILUTIONS DECIMALES.....	95
FIGURE 3. 15 BOITE DE CULTURE APRES 24H D'INCUBATION A 37 DEGRES.....	96
FIGURE 3. 16 MATRICES REPRESENTANT LA COMPLEXITE INTERNE DE LA BACTERIE EN FONCTION DE LEUR TAILLE.	97
FIGURE 3. 17 (I) SUIVI DE LA VIABILITE DES BACTERIES AU COURS DU TEMPS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SAPONINE. (II) SUIVI DE LA VIABILITE DES BACTERIES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SAPONINE APRES 2 MIN D'INCUBATION	98
FIGURE 3. 18 MATRICES DES DEUX SUSPENSIONS BACTERIENNES MARQUEES (I) AVANT ET (II) APRES L'EXPOSITION A L'EAU.	100
FIGURE 3. 19 SUIVI DE LA VIABILITE DES BACTERIES AU COURS DU TEMPS APRES L'EXPOSITION A L'EAU	100
FIGURE 3. 20 BANC EXPERIMENTAL.....	103
FIGURE 3. 21 DESIGN L-EDIT DU CIRCUIT MICROFLUIDIQUE, AVEC (I) DESIGN 1 : LARGEUR DES CANAUX 500 μ M, HAUTEUR 100 μ M, 23 COUDES (II) DESIGN 2 : LARGEUR DES CANAUX 1000 μ M, HAUTEUR 100 μ M, 21 COUDES. (III) TESTS FLUIDIQUES AVEC DES SOLUTIONS AQUEUSES COLOREES SUR LE DESIGN 1. (IV) TESTS	

FLUIDIQUES AVEC DES SOLUTIONS AQUEUSES COLOREES SUR LE DESIGN 2. LES DEUX STRUCTURES BICOUCHES SONT REALISES AVEC LE COLLAGE HUMIDE PDMS/HEXANE.....	104
FIGURE 3. 22. DESIGN L-EDIT DU CIRCUIT MICROFLUIDIQUE, AVEC (I) DESIGN 3 : LARGEUR DES CANAUX $W=500 \mu\text{M}$, HAUTEUR $H=100 \mu\text{M}$, 348 COUDES. (II) DESIGN 4 : LARGEUR DES CANAUX $1000 \mu\text{M}$, HAUTEUR $100 \mu\text{M}$, 223 COUDES. (III) PHOTOS DES PUCES ENDOMMAGEES A CAUSE D'UNE FUITE. (IV) TESTS FLUIDIQUES AVEC DES SOLUTIONS AQUEUSES COLOREES. LA STRUCTURE BICOUCHES EST REALISE AVEC LE COLLAGE HUMIDE PDMS/HEXANE.....	105
FIGURE 3. 23. (I) DESIGN L-EDIT DU CIRCUIT MICROFLUIDIQUE, AVEC LARGEUR DES CANAUX $500 \mu\text{M}$, HAUTEUR $100 \mu\text{M}$, 710 COUDES. (II) PHOTOS DES PUCES ENDOMMAGEES A CAUSE D'UNE FUITE. (III) PHOTOS DES PUCES SOUS ECOULEMENT FLUIDIQUE	106
FIGURE 3. 24. (I) DESIGN L-EDIT DU CIRCUIT MICROFLUIDIQUE AVEC LA GEOMETRIE FLOW-FOCUSING ; $W_C=W_I=500 \mu\text{M}$, $H=100 \mu\text{M}$, 480 COUDES, $A=60^\circ$. (II) PHOTOS DES PUCES SOUS ECOULEMENT FLUIDIQUE, LE DEBIT OPTIMAL APPLIQUE SUR CE DESIGN EST $40 \mu\text{L}/\text{MIN}$ POUR LES DEUX PREMIERES ENTREES (SANG ET SAPONINE) ET $80 \mu\text{L}/\text{MIN}$ POUR LA TROISIEME (EAU). (III) PHOTOS DES PUCES SOUS ECOULEMENT FLUIDIQUE.	107
FIGURE 3. 25. DESIGN L-EDIT DU CIRCUIT MICROFLUIDIQUE AVEC LA GEOMETRIE FLOW-FOCUSING ; $W_C=W_I=500 \mu\text{M}$, $H=100 \mu\text{M}$, 210 COUDES, $A=90^\circ$	108
FIGURE 3. 26 RESULTATS DES TESTS FLUIDIQUES A DIFFERENTS DEBITS.	109
FIGURE 3. 27 TESTS FLUIDIQUES AVEC DES SOLUTIONS AQUEUSES	110
FIGURE 3. 28 (I) TESTS FLUIDIQUES AVEC DES SOLUTIONS AQUEUSES (II) SIMULATION COMSOL 2D.	111
FIGURE 3. 29 PUCE SOUS FLUX SANGUIN.	112
FIGURE 3. 30 IMAGES PAR MICROSCOPE OPTIQUE DE L'ECHANTILLON DE SANG (I) AVANT ET (II) APRES LYSE.	112
FIGURE 3. 31 (I-II) MATRICE AVEC ACQUISITION DE LA DIFFUSION DIRECTE (FSC) ET DE LA COMPLEXITE (SSC) PERMETTANT DE CLASSER LES CELLULES SANGUINES SELON LEUR TAILLE ET LEUR COMPLEXITE , (III) POURCENTAGE DE CELLULES SANGUINES DANS LA SOLUTION AVANT ET APRES LYSE, (IV) ECHANTILLON SANGUIN AVANT ET APRES LA LYSE.	113
FIGURE 3. 32 MATRICE AVEC ACQUISITION DE (FSC) ET DE (SSC) PERMETTANT DE CLASSER LES CELLULES SANGUINES ET LES BACTERIES SELON LEUR TAILLE ET LEUR COMPLEXITE.....	115
FIGURE 3. 33 POURCENTAGE DES BACTERIES INTACTES AVANT ET APRES LA LYSE.	115
FIGURE 3. 34 MATRICE AVEC ACQUISITION DE (FSC) ET DE (SSC) PERMETTANT DE CLASSER LES CELLULES SANGUINES ET LES BACTERIES SELON LEUR TAILLE ET LEUR COMPLEXITE.....	116
FIGURE 3. 35 POURCENTAGE DES CELLULES SANGUINES AVANT ET APRES LA LYSE.	116
FIGURE 4. 1 DESIGN L-EDIT DU MODULE DE TRI.....	119
FIGURE 4. 2 BANC EXPERIMENTAL.....	120
FIGURE 4. 3 FOCALISATION DE PARTICULES DE $2 \mu\text{M}$ POUR DIFFERENTS DEBITS A LA SORTIE DU MODULE DE TRI (I). RAPPORT RF EN FONCTION DU DIAMETRE DES PARTICULES (II). POURCENTAGE DES PARTICULES COLLECTEES AUX DEUX SORTIES 1 ET 2 DU CANAL (III).	122
FIGURE 4. 4 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE $100 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), $200 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) $300 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (III) ET DE $400 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (IV).	123
FIGURE 4. 5 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES DES PARTICULES DE $5 \mu\text{M}$ ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE $500 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), $600 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) $700 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (III) ET DE $800 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (IV).	124
FIGURE 4. 6 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE $100 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), $200 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) $300 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (III) ET DE $400 \mu\text{L}/\text{MIN}$ (IV).	126

FIGURE 4. 7 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES DES PARTICULES DE 5 ET DE 15 μM ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE 500 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), 600 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) ET DE 700 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (III).	127
FIGURE 4. 8 (I) IMAGES FLUORESCENTES DE PARTICULES A DIFFERENTS ENDROITS DU CANAL EN SERPENTIN AU DEBIT OPTIMAL. (II) PROFIL D'INTENSITE DE FLUORESCENCE EN COUPE TRANSVERSALE DU CANAL A LA SORTIE DE LA PUCE.....	128
FIGURE 4. 9 (A) IMAGES FLUORESCENTES PRISES A LA SORTIE DU CANAL POUR DES PARTICULES DE DIFFERENTES TAILLES DANS DIVERSES CONDITIONS D'ECOULEMENT ; (B) TRADUCTION DU MODELE DE FOCALISATION DES PARTICULES EN TROIS REGIONS STANDARD DANS L'ESPACE NOMBRE DE REYNOLDS - DIAMETRE DES PARTICULES [67].....	129
FIGURE 4. 10 SCHEMA REPRESENTANT L'ACTION DE LA FORCE CENTRIFUGE ET LA FORCE DE DEAN SUR LES PARTICULE EN SUSPENSION DANS UN FLUIDE [66].	129
FIGURE 4. 11. DONNEES DE CYTOMETRIE EN FLUX DES SOLUTIONS COLLECTEES A L'ENTREE ET AUX SORTIES #1 ET #2 (I). POURCENTAGE DE PARTICULES COLLECTEES AUX DEUX SORTIES 1 ET 2 (II). IMAGES DE LA SUSPENSION DE PARTICULES AVANT ET APRES LE TRI (III).	130
FIGURE 4. 12 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES DES E. COLI ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE 100 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), 200 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) ET DE 600 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (III). ...	132
FIGURE 4. 13 (I) IMAGE PRISE A LA SORTIE DU CANAL (II) POURCENTAGE DES BACTERIES COLLECTEES AUX DEUX SORTIES 1 ET 2 DU CANAL.	132
FIGURE 4. 14 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES DES PARTICULES DE 2 μM ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE 100 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), 200 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) ET DE 600 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (III). RAPPORT RF EN FONCTION DU DIAMETRE DESPARTICULES (IV). POURCENTAGES DES PARTICULES COLLECTEES AUX DEUX SORTIES 1 ET 2 DU CANAL (V).	133
FIGURE 4. 15 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES DES PARTICULES DE 2 μM A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE 600 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ A DIFFERENTES HAUTEURS DU CANAL (I) H=40 μM ET (II) H= 20 μM	134
FIGURE 4. 16 IMAGES FLUORESCENTES DES POSITIONS LATERALES DES E. COLI ET LEURS PROFILS D'INTENSITE A LA SORTIE DU CANAL POUR UN DEBIT DE 100 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (I), 200 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (II) ET DE 600 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ (III). ...	135
FIGURE 4. 17 (I) IMAGE PRISE A LA SORTIE DU CANAL (II) POURCENTAGE DES BACTERIES COLLECTEES AUX DEUX SORTIES 1 ET 2 DU CANAL.	135
FIGURE 5. 1 DESIGN L-EDIT DU MODULE INTEGRE	138
FIGURE 5. 2 (I) PUCE SOUS FLUX SANGUIN, (II)POURCENTAGE DE CELLULES SANGUINES DANS LA SOLUTION AVANT ET APRES LYSE ET (III) MATRICES AVEC ACQUISITION DE LA DIFFUSION DIRECTE (FSC) ET DE LA COMPLEXITE (SSC) PERMETTANT DE CLASSER LES CELLULES SANGUINES SELON LEUR TAILLE ET LEUR COMPLEXITE.	139
FIGURE 5. 3 (I) PUCE SOUS FLUX (MODULE DE TRI) AVEC LE PROFIL D'INTENSITE DE FLUORESCENCE EN COUPE TRANSVERSALE DU CANAL A LA SORTIE DE LA PUCE, (II) LES DONNEES DE CYTOMETRIE EN FLUX DES SOLUTIONS COLLECTEES A LA SORTIE #1 ET #2, (III) POURCENTAGE DE PARTICULES COLLECTEES AUX DEUX SORTIES 1 ET 2.	140
FIGURE 6. 1 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE.....	143
FIGURE 6. 2 BANC EXPERIMENTAL.....	144
FIGURE 6. 3 SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES UTILISEES	145
FIGURE 6. 4 ETAPES DE LA CONSTRUCTION DU BIOCAPTEUR D'ADN (PT).	147
FIGURE 6. 5 MECANISME D'ELECTRO-GREFFAGE DE L'ETHYLENEDIAMINE.....	147
FIGURE 6. 6 VOLTAMMOGRAMMES OBTENUS AU COURS DU GREFFAGE ELECTROCHIMIQUE DE L'AMINE SUR LA SURFACE PLATINE.....	148

FIGURE 6. 7 LA MOLECULE SULFO SMCC	149
FIGURE 6. 8 VOLTAMOGRAMMES OBTENUS EN MICROFLUIDIQUE, DANS UNE SOLUTION DE FERRI / FERROCYANURE 20 MM ET NA CL 0,5 M (COURBE NOIR), APRES IMMOBILISATION DE L'EDA (COURBE ROUGE), IMMOBILISATION DU SULFO SMCC (COURBE BLEUE) ET APRES IMMOBILISATION DE LA SEQUENCE D'ADN SONDE (COURBE VERTE)	151
FIGURE 6. 9 SUIVI DE L'HYBRIDATION DE L'ADN PAR VOLTAMMETRIE CYCLIQUE	152
FIGURE 6. 10 COURBES DE CALIBRATION APRES LA NORMALISATION DES NIVEAUX DE COURANTS.....	153
FIGURE 6. 11 COURBE DE CALIBRATION D'UNE SEQUENCE CIBLE COMPLEMENTAIRE A LA SEQUENCE SONDE GP8 (COURBE NOIRE) COMPAREE AU COURBE DE CALIBRATION POUR UNE SEQUENCE CIBLE GP2 NON- COMPLEMENTAIRE DE LA SONDE (COURBE ROUGE).....	153
FIGURE 6. 12 CREATION DE PONT DISULFURE	155
FIGURE 6. 13 REDUCTION DES LIAISONS DISULFURE ORGANIQUES A L'AIDE DE TCEP	155
FIGURE 6. 14 EFFET DU TCEP SUR LA FONCTIONNALISATION DES SONDES D'ADN	156
FIGURE 6. 15 EVOLUTION EXPERIMENTALE DU TAUX DE GREFFAGE DE SURFACE SIMULEE AVEC L'ISOTHERME DE HILL-LANGMUIR SELON L'EQUATION (37) OU LES PARAMETRES K_A , N ET θ_{MAX} SONT EGAUX RESPECTIVEMENT A $(0,28 \pm 0,07)$ MM, $(2,99 \pm 0,69)$ ET $(0,393 \pm 0,004)$	157
FIGURE 6. 16 VOLTAMOGRAMMES OBTENUS EN MICROFLUIDIQUE, DANS UNE SOLUTION DE FERRI / FERROCYANURE 20 MM ET NA CL 0,5 M (COURBE NOIR), APRES IMMOBILISATION DE LA SEQUENCE D'ADN SONDE SANS TCEP (COURBE ROUGE), APRES IMMOBILISATION DE LA SEQUENCE D'ADN SONDE AVEC TCEP (COURBE BLEUE).....	158
FIGURE 6. 17 EFFET DU MCH LORS DES ETAPES DE LA CONSTRUCTION DU BIOCAPTEUR D'ADN (PT).	159
FIGURE 6. 18 COURBES DE CALIBRATION A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU MCH, (I) MCH A 10^{-2} M, (II) MCH A 2.5×10^{-2} M, (III) MCH A 5×10^{-2} M, (IV) MCH A 10^{-1} M. CHAQUE POINT CORRESPOND A 4 MESURES.	160
FIGURE 6. 19 COURBES DES CALIBRATIONS CORRESPONDANT A L'HYBRIDATION D'ADN AVEC (COURBE NOIRE) AVEC LA CONCENTRATION OPTIMALE (5×10^{-2} M) ET SANS L'INTRODUCTION DU MCH (COURBE ROUGE). CHAQUE POINT CORRESPOND A 5 MESURES.....	161
FIGURE 6. 20 VOLTAMOGRAMMES OBTENUS EN MICROFLUIDIQUE, DANS UNE SOLUTION DE FERRI / FERROCYANURE 20 MM ET NA CL 0,5 M (COURBE NOIR), APRES IMMOBILISATION DE LA SEQUENCE D'ADN SONDE AVEC TCEP A 5 MM (COURBE ROUGE).....	162
FIGURE 6. 21 SUIVI DE L'HYBRIDATION DE L'ADN PAR VOLTAMMETRIE CYCLIQUE.	163
FIGURE 6. 22 COURBE DE CALIBRATION D'UNE SEQUENCE CIBLE COMPLEMENTAIRE A LA SEQUENCE SONDE GP8 (COURBE NOIRE) COMPAREE AU COURBE DE CALIBRATION POUR UNE SEQUENCE CIBLE GP2 NON- COMPLEMENTAIRE DE LA SONDE (COURBE ROUGE). CHAQUE POINT CORRESPOND A 4 MESURES.	163
FIGURE A. 1 SCHEMA EQUIVALENT DU CIRCUIT MICROFLUIDIQUE	182
FIGURE A. 2 QUADRILLAGE DE 100 RECTANGLES	188
FIGURE A. 3 NUMERATION SUR UN RECTANGLE	189
FIGURE A. 4 TRI DES BACTERIES DANS LE DESIGN 1 (H= 40 μ M).	190
FIGURE A. 5 TRI DES PARTICULES DE 2 μ M DANS LE DESIGN 2 (H= 20 μ M).....	190
FIGURE A. 6 TRI DES BACTERIES DANS LE DESIGN 2 (H= 20 μ M)	191
TABLEAU 1. 1 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES CELLULES DU SANG HUMAIN [6].....	16
TABLEAU 1. 2 COMPARAISON DES TECHNIQUES CLASSIQUES DE TRI CELLULAIRE [14]	21
TABLEAU 1. 3 LISTE DES PRINCIPAUX IONS ET DE LEUR CONCENTRATION DANS LE PLASMA [6]	55
TABLEAU 1. 4 METHODES COURANTES D'IMMOBILISATION DE L'ADN [91], [27].	61

TABLEAU 2. 1 PARAMETRES UTILISES EN PHOTOLITHOGRAPHIE POUR OBTENIR LES HAUTEURS DE
MICROCANAUX SUIVANTES : 20, 40 ET 100 μM 72