



HAL
open science

Milli-fluidique digitale pour la microbiologie

Fabien Bertholle, Jérôme Bibette

► **To cite this version:**

Fabien Bertholle, Jérôme Bibette. Milli-fluidique digitale pour la microbiologie. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie UPMC Paris VI, 2010. Français. NNT: . tel-01116366

HAL Id: tel-01116366

<https://pastel.hal.science/tel-01116366>

Submitted on 13 Feb 2015

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

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



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE
ANALYTIQUE DE PARIS-CENTRE

LABORATOIRE COLLOÏDES ET MATÉRIAUX DIVISÉS

MILLI-FLUIDIQUE DIGITALE POUR LA MICROBIOLOGIE

PRÉSENTÉE PAR :

FABIEN BERTHOLLE

SOUTENUE LE 2 DÉCEMBRE 2010

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

MME	ANNIE COLIN	RAPPORTEUR
M	ANDREW GRIFFITHS	RAPPORTEUR
MME	VALÉRIE CABUIL	EXAMINATEUR
M	PASCAL PANIZZA	EXAMINATEUR
M	JÉRÔME BIBETTE	DIRECTEUR DE THÈSE

Table des matières

1	Comportement bactérien en présence d'antibiotiques	7
1.1	Généralités	8
1.1.1	Croissance bactérienne	8
1.1.2	Action des antibiotiques	14
1.1.3	La pharmacodynamie	17
1.2	Mesure de la CMI	18
1.2.1	Méthodes par diffusion	19
1.2.2	Méthodes par dilution	23
1.3	L'effet de l'inoculum	25
1.3.1	Quorum-sensing	29
1.3.2	Destruction du biocide	31
1.3.3	Variabilité phénotypique	35
1.3.4	L'altruisme bactérien	38
1.3.5	Le biofilm protecteur	40
1.3.6	Dépendance entre la CMI et l'inoculum	42
2	Milli-fluidique et microbiologie	49
2.1	La microbiologie explorée avec des outils miniaturisés	50
2.1.1	Concordance des échelles de tailles	51
2.1.2	La micro-fabrication	53
2.1.3	Applications en microbiologie	55
2.1.4	Détermination de la CMI par des micro-systèmes	56

2.1.5	Les laboratoires sur puce	57
2.2	Microbiologie en gouttes	59
2.2.1	Écoulements diphasiques dans un micro-système	60
2.2.2	Contrôle en composition des gouttes	65
2.2.3	Encapsulation d'organismes	67
2.2.4	Distribution d'organismes en goutte	68
2.2.5	Bioréacteurs sur puce	71
2.2.6	Applications en pharmacologie	72
2.3	La milli-fluidique	76
3	Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique	83
3.1	Matériel biologique	85
3.2	Physico-chimie des réacteurs et encapsulation	87
3.3	Détection de la fluorescence en goutte	90
3.3.1	Module expérimental	90
3.3.2	Acquisition de la mesure de la fluorescence en goutte	92
3.4	Manipulation de gouttes pour des mesures temporelles	94
3.5	Séparateur	97
3.6	Croissance d'organismes en gouttes	100
3.6.1	Méthode de traitement des données	101
3.6.2	Analyse des données	104
3.7	Création d'un gradient d'antibiotique	106
3.7.1	Marquage fluorescent de la concentration en antibiotique	107
3.7.2	Principe	108
3.7.3	Exemple de dynamique de gradient	109
4	Inhibition de la croissance bactérienne.	117
4.1	Détermination de la CMI du céfotaxime	118
4.2	Influence de l'inoculum sur la CMI	125

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier Jérôme Bibette pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés. Je tiens également à remercier Jean Baudry et Nicolas Bremond et tous les membres du LCMD pour leurs conseils avisés. Je remercie également Enric Santanach et Jean-Yves Le Doujet toujours disponibles pour nous aider.

Ensuite je remercie chacun des membres du jury de la soutenance de thèse et leur fais part de ma gratitude pour leur appréciation de ce travail.

Je remercie également Damien Lucot, Guilhem Velve-Casquillas et Yong Chen pour m'avoir mis le pied à l'étrier dans le domaine des micro-technologies lors de mon stage de MASTER au sein du LPN.

Je remercie tout particulièrement Abdou Rachid Thiam et Julie Gorge pour leur soutien, leur disponibilité et pour tous les bons moments passés ensemble pendant nos trois années communes en tant que thésards au LCMD.

Enfin je remercie mes parents et mon frère pour leur soutien. Je remercie tout particulièrement Lolita sur qui je pourrai toujours compter. Et pour finir Adrien, Ludo, Somali et Clément.

Un grand merci à tous.

Remerciements

Introduction

Avant propos

Nous connaissons tous un des slogans du ministère de la santé : "les antibiotiques, c'est pas automatique". Le principal objectif de cette campagne était d'informer les gens pour qu'ils aient une meilleure utilisation des antibiotiques, afin de préserver leur efficacité. En effet, la sur-consommation des antibiotiques a favorisé l'émergence d'organismes mutants de plus en plus résistants aux traitements [8, 61]. Mais les mutations sont en général des processus longs. Avant même de muter, les organismes ont la possibilité de résister à un sous dosage en antibiotique. Cette résistance est mesurée dans le cadre d'applications en pharmacologie. Les méthodes de mesures employées révèlent déterminent le sous dosage en antibiotique, mais avec une très faible résolution sur la concentration.

Les progrès technologiques accomplis dans le domaine de la miniaturisation depuis les années 1980 ont permis d'engendrer des structures confinées à l'échelle du micron. Ces procédés répondent techniquement aux nécessités dans le domaine de la microbiologie. En effet, les puces micro-fluidiques permettent le transport et la manipulation de très petites quantités d'échantillons. Ces puces intègrent en série des opérations successives permettant des analyses biologiques. Les micro-fabrications sont également utilisées pour produire de façon contrôlée et périodique des gouttes d'émulsion très monodisperses. Dans ces gouttes il est possible de retenir des composés d'intérêt biologiques. Un axe majeur de la micro-fluidique est l'utilisation de gouttes d'émulsion comme bio-réacteur. Ceci implique que les applications des technologies de micro-fluidique digitale se diversifient dans le domaine de la microbiologie [3, 51, 56, 87].

Avant propos

Au cours de cette thèse, nous avons développé un outil d'échelle supérieure à la micro-fluidique. Cet outil fait partie de procédés techniques nommés milli-fluidique. Les circuits mis au point sont constitués de capillaires de section sub-millimétrique connectés les uns aux autres au moyen de pièces usinées à cet effet. Même si ce domaine est une échelle au-dessus de la micro-fluidique, il est régi par les mêmes lois que la micro-fluidique [37]. Nous nous sommes focalisés sur la transposition en milli-fluidique de fonctions micro-fluidique, et notamment, sur la co-encapsulation d'organismes et d'antibiotiques en goutte. Cela dans le but de mesurer l'activité bactérienne soumise à différentes intensités de stress antibiotique, par la mise au point d'un instrument automatisé.

Le plan de ce mémoire suit le déroulement de l'introduction. Le premier chapitre introduira le contexte pharmacologique. Plus précisément, la croissance en l'absence et en présence d'antibiotique sera exposée. Puis, l'accent sera mis sur les procédés de mesure du sous dosage en antibiotique. Ces mesures mettent en avant un phénomène dont la validité ainsi que les origines possibles seront finalement discutées.

Le second chapitre introduira un domaine technologique en plein essor appliqué en microbiologie. Ce domaine est la milli-fluidique, et fait parti de la famille des micro-fabrications. Ces dernières seront décrites succinctement afin de percevoir leur potentiel. Puis, une branche des micro-fabrications sera plus précisément détaillée : la micro-fluidique digitale. Cela permettra de poursuivre sur les perspectives d'applications technologiques et biologiques en gouttes, par l'utilisation de la milli-fluidique.

Le troisième chapitre décrira le procédé de mesure mis en place. Les principes et stratégies y seront détaillés. Puis les applications y seront discutées.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre proposera la quantification d'un effet de résistance lié à la taille de la population.

Chapitre 1

Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Dans ce chapitre nous introduirons les concepts liés à la croissance d'organismes. Puis nous établirons que le domaine d'étude des actions des antibiotiques fait ressortir un paramètre expérimental très utilisé. Nous montrerons comment ce paramètre est déterminé. Ensuite nous établirons les origines possible de l'altération de ce paramètre de mesure par la densité de micro-organismes initialement présents. Enfin nous étudierons la dépendance du paramètre de mesure d'action des antibiotiques avec le nombre de cellules présentes.

1.1 Généralités

L'examen de la réaction bactérienne en présence d'antibiotique traite la réponse des bactéries à l'action d'une dose d'antibiotique. Avant toute étude impliquant les antibiotiques, il est nécessaire de connaître l'attitude des micro-organismes sans facteur de stress. Notamment par le comportement de la croissance, celle-ci étant l'indicateur de l'activité d'une population bactérienne. Les antibiotiques, étant fréquemment utilisés afin d'éliminer les agents infectieux, perturbent le développement cellulaire. La croissance est donc plus ou moins fortement altérée par la présence d'antibiotiques. L'action produite par les antibiotiques est déterminée en ciblant toute avarie portée sur la croissance bactérienne.

1.1.1 Croissance bactérienne

La croissance est définie par une augmentation des constituants cellulaires de micro-organismes. Elle peut se traduire par une augmentation de la taille des organismes et/ou du nombre d'organismes [77].

Mode de reproduction

La croissance se traduit par l'accumulation de constituants cellulaires au sein d'un organisme. Cela aboutit à un accroissement du nombre de cellules lorsque les

micro-organismes se multiplient par segmentation ou par bourgeonnement. Afin de

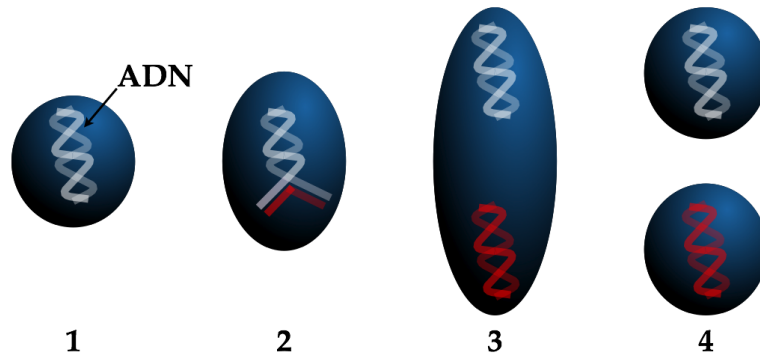


FIGURE 1.1 – Représentation simplifiée de la reproduction par segmentation.

se développer en nombre, une part importante des micro-organismes se multiplient de manière asexuée par division cellulaire. Le matériel génétique se réplique au sein de l'organisme, celui-ci voit sa membrane s'allonger. Une fois la duplication de l'ADN effectuée (2^{ème} étape de la figure 1.1 p.9), le double bagage génétique se sépare et les brins d'ADN migrent vers les extrémités opposées de la cellule (3^{ème} étape). Cet organisme finit par se scinder en deux au niveau de la zone équatoriale nommée septum (4^{ème} étape). De cette façon un organisme engendre une cellule fille et continue sa propre division, et les cellules filles en font de même.

Il n'est pas évident d'analyser la croissance et la division individuellement à cause de la petite taille des micro-organismes (ordre de grandeurs table 2.1 p.52). La croissance est donc principalement suivie par la détection de la variation du nombre de cellules.

Analyse de la croissance

Tout comme dans la nature, la culture *in vitro* de micro-organisme s'effectue fréquemment dans un système fermé, limité en nutriments [57, 75, 83]. La figure 1.2 (p.10) montre le comportement de la croissance d'une population se divisant

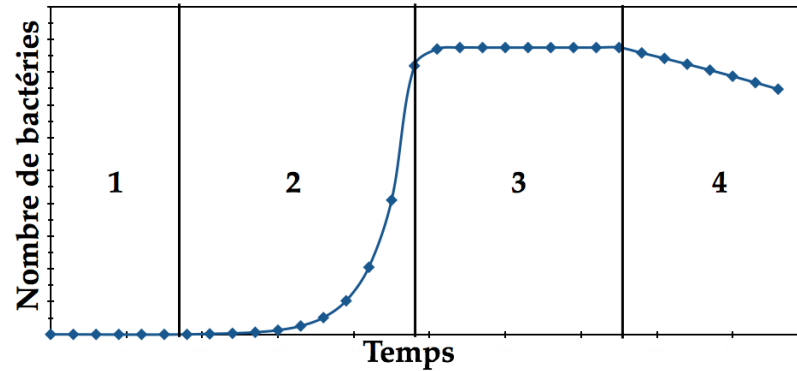


FIGURE 1.2 – Modèle de croissance et les quatre principales phases.

par segmentation. Cette représentation de l'évolution du nombre d'organismes en fonction de la période d'incubation révèle quatre phases distinctes lors de la croissance [73] :

1. La phase de la latence.

Lorsque les micro-organismes sont introduits dans un milieu de culture neuf, le nombre ou la masse cellulaire n'augmente pas instantanément. La période d'attente avant le début de la croissance est la phase de latence. Cette période est nécessaire à l'adaptation des organismes au nouveau milieu de culture. Le délai avant la croissance dépend de l'âge des bactéries, ainsi que de la similarité en composition du nouveau milieu de culture avec le milieu initial où ont été prélevés les organismes.

2. La phase exponentielle.

Lors de cette phase chaque micro-organisme procède à son développement par division à intervalle de temps constant, définissant τ comme le temps de division des organismes d'une population. Le temps de division reste constant tant que les paramètres de croissance restent stables (température, pH, pression osmotique...), et tant que l'organisme n'est pas soumis à un facteur de stress. L'inoculum, n_i , est le nombre initial de cellules introduites. La période, τ , durant laquelle une cellule mère se développe engendrant une cellule fille

est une génération, comme schématisé dans la figure 1.1 (p.9). Chaque organisme se divise selon ce mode de reproduction, les mères comme les filles, chacune de ces cellules se divisent sur n_G générations jusqu'à épuisement des nutriments (figure 1.3 p.11). Le milieu contient donc $n_i \cdot 2^{n_G}$ organismes à la

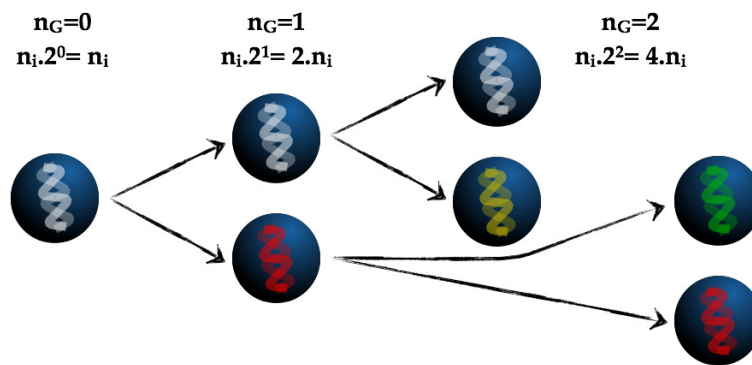


FIGURE 1.3 – Représentation de deux générations.

fin de la croissance. La période finale de croissance, t_F , dépend du nombre final de générations et du taux de croissance, τ :

$$t_F = \tau \cdot n_G$$

Ce qui permet de déduire à tout instant, t :

$$t = \tau \cdot n_t \Rightarrow n_t = t/\tau$$

n_t étant le nombre de générations accomplies à cet instant. De ce fait, le nombre de cellules présentes en fonction du temps, $N(t)$ est défini par :

$$N(t) = n_i \cdot 2^{t/\tau} \tag{1.1}$$

Ce modèle théorique de croissance explique la pente de la phase exponentielle et décrit la reproduction des cellules au cours du temps de croissance.

3. La phase stationnaire.

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

La carence en nutriments et/ou la réduction de substances essentielles, comme par exemples la limitation en dioxygène pour les organismes aérobies, ou l'accumulation de déchets toxiques pour les organismes anaérobies, termine la croissance et le nombre final d'organismes est ainsi atteint. Durant cette phase la taille de la population ne change pas, ceci peut résulter d'un équilibre entre division et mort cellulaire, ou bien la population peut cesser de se diviser et rester métaboliquement active.

4. La phase de mortalité.

La pénurie de nutriments et l'accumulation de déchets toxiques conduisent finalement à la diminution de cellules viables. La mort des organismes est définie comme la perte irréversible de la capacité de se diviser. Bien que les bactéries meurent de façon continue (et constante) le taux de mortalité peut diminuer après une réduction drastique de la population. Ceci est dû à la survie d'organismes particulièrement résistants.

Techniques de culture

La source en nutriment des organismes peut être préparée de deux façons. La composition ne change pas selon les méthodes, l'état du bouillon de culture est le seul qui diffère. Toutes les bactéries ont besoin d'eau, d'une source d'énergie (lumière ou oxydation de composés organiques ou inorganiques), d'une source de carbone, d'une source d'azote et d'éléments minéraux (principalement soufre et phosphore présents dans les acides aminés et nucléiques). Ces besoins élémentaires sont suffisants pour permettre la nutrition des bactéries qualifiées de prototrophes. Certaines bactéries qualifiées d'auxotrophes nécessitent, en plus des besoins élémentaires, la présence de facteurs de croissance (composé(s) chimique(s) dont un organisme ne peut assurer la synthèse).

Le mode de préparation le plus simple est la culture en volume liquide. Celle-ci se prépare par dilution des éléments nutritifs, listés précédemment, dans de

l'eau stérilisée. La seconde méthode consiste à produire le milieu de culture sous forme d'un gel durci. Pour la préparation il faut ajouter une certaine proportion de poudre d'Agar à une solution liquide du milieu de culture. Ensuite il faut homogénéiser la solution puis la stériliser à 120°C pendant environ trente minutes. Il faut ensuite faire couler le milieu de culture avec l'Agar dans des récipients (les plus communs sont les boîtes de Pétri) et laisser refroidir à température ambiante pendant plusieurs heures pour que la solution gélifie.

Méthodes de mesure

Pour établir la croissance bactérienne de nombreuses méthodes existent et permettent de mesurer la quantité d'organismes [72]. Ces méthodes de quantification établissent un suivi du nombre d'organismes par unité de temps ou de volume. Le recensement s'établit soit par mesure de l'activité cellulaire (comptage indirect), soit par comptage direct des micro-organismes.

Mesure de l'activité cellulaire Ces méthodes quantifient les changements que produisent les organismes pendant la croissance sur leur environnement. La croissance se traduit par la consommation d'un substrat (source de nutrition), dont la concentration peut être dosée. Il peut être également possible de mesurer la production de constituants cellulaires, principalement la quantité d'enzymes ou de déchets. Le suivi des variations des propriétés physico-chimique du milieu est aussi un procédé de quantification d'organismes : le pH, le potentiel d'oxydoréduction ou l'impédance du milieu, sont des paramètres changeants selon la densité cellulaire.

Mesure du nombre d'organismes Les méthodes de comptages sont diverses, en premier lieu de multiples méthodes permettent d'établir la concentration des organismes. Les hématimètres, par exemple, sont des lames creusées de petites chambres de comptage à l'oeil, quadrillées pour aider l'expérimentateur (de nombreuses versions existent : les cellules de Lemaure, Malassez, Nageotte, Neubauer,

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Thoma). L'injection d'un petit volume contenant des organismes dans la lamelle donne accès au nombre d'organismes par carreaux, ce qui permet d'estimer la concentration d'organismes.

La numération par épifluorescence donne accès au nombre de bactéries par unité de volume par l'observation, en microscopie, de la fluorescence des organismes. Cette méthode a l'avantage de s'affranchir des cellules mortes. Cette technique est de plus en plus utilisée, surtout depuis 1994 et l'utilisation du marqueur GFP (Green Fluorescent Protein découvert en 1962) en tant que rapporteur de la présence bactérienne [27].

Il est également possible de dénombrer les cellules en surface, après étalements de différentes dilutions du milieu de culture sur différentes surfaces de gélose, ou par concentration d'une culture sur une membrane filtrante. Après dilution ou filtration les organismes se retrouvent isolés les uns des autres ou en très faible concentration. Ce qui fait que l'ensemencement permet aux organismes de se multiplier lors de l'incubation et former des "patches" en surface. Ces "patches" sont des colonies composées de nombreux organismes issues d'un individu. De cette façon le comptage de la totalité des colonies finalement formées (*cfu*) détermine le nombre d'organismes initialement présents.

D'autres méthodes établissent le nombre exact de cellules (au facteur de résolution de la méthode de mesure près). La détermination du poids sec (récolte d'organismes par centrifugation ou par filtration sur membrane) révèle la masse totale d'organismes. Par cytométrie, il est possible de compter les cellules dans un échantillon très dilué. Et finalement le procédé le plus utilisé : la turbidimétrie. Ce procédé mesure l'absorbance du milieu et l'application de la loi de Beer-Lambert révèle la concentration en organismes dans le milieu.

1.1.2 Action des antibiotiques

La reproduction sans contraintes des organismes est un mécanisme bien assimilé. La croissance de populations peut être altérée par divers paramètres ex-

tracellulaires, notamment par des agents chimiques naturels ou de synthèse : les antibiotiques (appelés aussi anti-microbiens, biocides ou anti-bactériens). Depuis leur découverte au 20^{ème} siècle, les anti-microbiens ont permis de détruire considérablement la menace de maladies infectieuses. L'utilisation de ces molécules dans la conception de "médicaments miracles" a engendré une baisse spectaculaire de la mortalité imputable à des maladies autrefois courantes et fréquemment mortelles. Ils ont contribué à la grande progression de l'espérance de vie observée dans la dernière partie du 20^{ème} siècle selon un rapport de l'OMS [76]. Les antibiotiques ont une grande efficacité car ils agissent à faible dose (de l'ordre du mg/L ou $\mu g/mL$).

Il existe deux grandes classes d'antibiotiques :

- Les bactériostatique : ce sont les biocides capables d'arrêter la croissance des bactéries. En empêchant la prolifération bactérienne, ils facilitent donc la destruction des germes par les défenses de l'hôte.
- Les bactéricides : ce sont les biocides qui éliminent les organismes.

Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. Les antibiotiques ont plusieurs modes d'actions pour inhiber et/ou détruire les bactéries (figure 1.4 p.16).

Destruction de la membrane des cellules Par ce mode d'action, les antibiotiques dissolvent la membrane extracellulaire des organismes libérant ainsi certains éléments cellulaires essentiels hors de l'organisme.

Action sur la paroi des cellules Par ce mode d'action, les antibiotiques agissent par affinité sur des cibles extracellulaires d'organismes actifs (se répliquant). Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi, la cellule engrange les constituants cellulaires et explose sous l'effet de la pression osmotique. Ce type de destruction est appelé lyse.

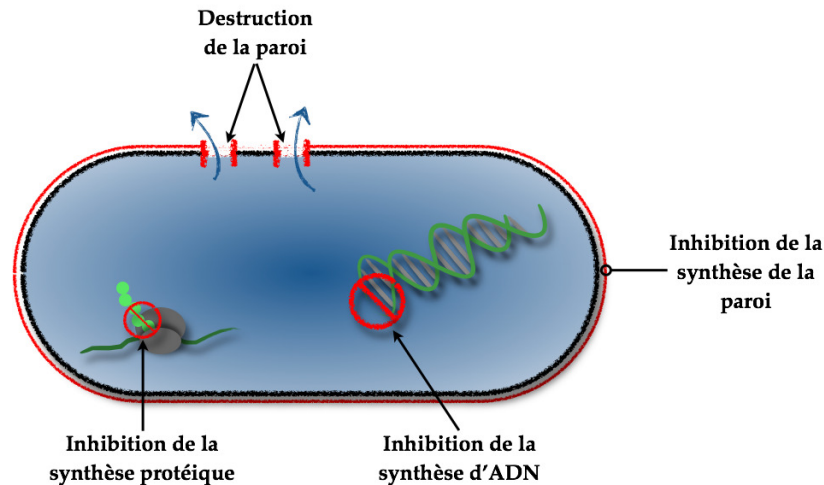


FIGURE 1.4 – Schématisation des modes d'action des antibiotiques.

Action sur l'ADN Par ce mode d'action, les antibiotiques empêchent la répllication de l'ADN et donc la croissance des bactéries.

Perturbation de la synthèse protéique Par ce mode d'action, les antibiotiques ont pour cible l'élément cellulaire responsable de la synthèse des protéines : le ribosome. Par cette action les cellules ne sont pas capable de synthétiser correctement des protéines et sont affectées dans leur organisation et développement.

Ainsi, quelque soit le type d'action que produit un antibiotique sur un organisme, il en modifie la croissance. Si les bactéries sont utilisées dans le domaine industriel, notamment dans la fermentation ou en tant qu'éléments de synthèse de certains antibiotiques, les bactéries sont souvent source d'infections. Et en terme de santé publique si un état pathologique n'est pas traité, cela accroît le risque de décès de l'hôte, et allonge également sa période de contagiosité [76].

Les études de l'action des antibiotiques sont menées principalement en pharmacologie. Elles s'exercent aussi dans le cadre de l'évolution, par l'étude de l'adaptation et la mutation d'organismes qui résistent aux anti-microbiens. Ces deux do-

maines sont liés, notamment par l'apparition et la propagation de germes résistants aux antibiotiques. L'évolution est le degré supérieur des études du comportement bactérien en présence d'antibiotique. En pharmacologie, le principal aspect des études est de tester l'action curative des antibiotiques en vue de déterminer leurs posologies.

1.1.3 La pharmacodynamie

La pharmacodynamie est un paramètre pharmacologique de l'étude de l'action des antibiotiques sur les organismes. Ce critère permet de déterminer, entre autres, l'efficacité et l'activité d'un antibiotique. L'objectif de la conception d'un médicament antibiotique est d'être actif sur les agents infectieux à des doses nécessaires et suffisantes à la désinfection. En effet le dosage thérapeutique ne dépend pas de la masse bactérienne à éliminer, il est basé sur la résistance des organismes à un sous dosage en biocide. Il est possible de déterminer par diverses techniques la concentration minimale en antibiotique qu'il faut pour inhiber le développement des organismes : la Concentration Minimale Inhibitrice (**CMI**). L'examen standard pour évaluer l'activité anti-bactérienne *in vitro* est donc de déterminer la CMI (MIC en anglais) [101].

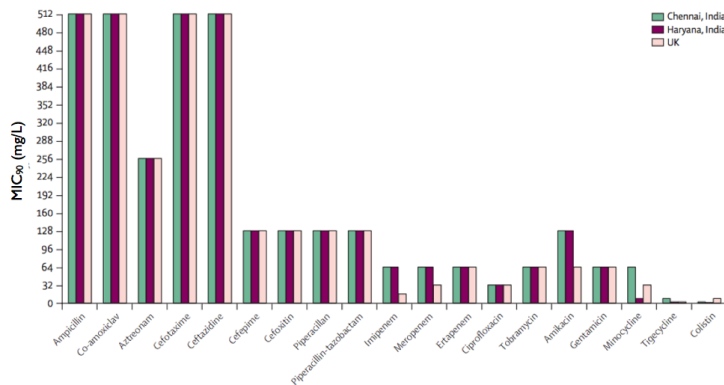


FIGURE 1.5 – Mesures des CMI de divers antibiotique sur la nouvelle bactérie "super-résistante" (NDM-1) [61].

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

La CMI d'un antibiotique contre un agent pathogène est généralement le principal paramètre déterminant le meilleur biocide pour remédier à une infection [79, 80]. La CMI est en tout cas le premier paramètre recherché lors de l'étude de traitement antibiotique. Pour exemple les études récentes portant sur l'émergence d'une souche de bactéries "super-résistantes" [8, 61] sont résumés par la détermination de la CMI d'antibiotiques sur cette souche (figure 1.5 p.17).

Par définition, la CMI est la concentration minimale en antibiotique nécessaire pour au moins inhiber la présence bactérienne de la majeure partie de la population. Il existe deux procédures pour évaluer la CMI (figure 1.6 p.19) :

- Par élimination. Par cette méthode des échantillons d'une très large population initiale de bactéries sont incubés en présence d'antibiotique. Le principe est d'observer le déclin de la masse bactérienne, ou non pour évaluer la CMI. Les travaux réalisés présentent la CMI nécessaire à éliminer $X\%$ de la population à une période donnée : CMI_X .
- Par inhibition de la croissance. Par cette méthode des échantillons d'une plus faible population initiale en bactéries sont incubés en présence d'antibiotique. Le principe est d'observer l'augmentation de la masse bactérienne, ou non pour évaluer la CMI.

Par extension la CMI est considérée dans la majorité des cas comme la concentration minimale nécessaire à perturber plus ou moins fortement la capacité de survie des organismes. La CMI est un paramètre dépendant fortement de la résolution des outils employés à sa mesure. Quelque soit le procédé (élimination ou inhibition) la quantité minimale de bactéries détectables par les outils de mesure influence la détermination de la CMI.

1.2 Mesure de la CMI

Il a été relevé précédemment que les méthodes de mesures classiques employées pour la détermination de la CMI altèrent la précision du résultat. Cette section pré-

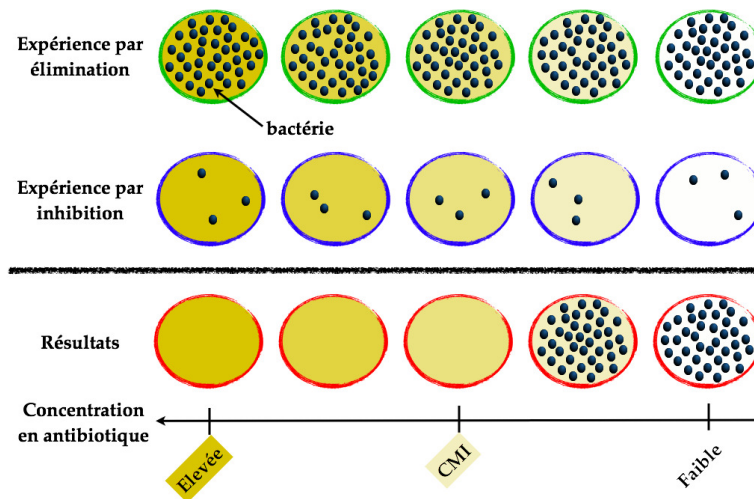


FIGURE 1.6 – Schématisation des deux procédures de mesure de la CMI.

sente les procédés courants de mesure de la CMI. Il existe deux principes pour les mesures, le premier basé sur la diffusion d'antibiotique(s) à la surface des échantillons de croissance. Le second se base sur la dilution d'anti-bactériens dans le milieu de croissance des organismes.

1.2.1 Méthodes par diffusion

Ces méthodes sont considérées comme les plus simple d'utilisation [22]. Elles reposent sur la diffusion d'un antibiotique à la surface d'un milieu de culture gélosé. Cette surface gélosé est la source en nutriments des organismes, ce sont des procédés bien connu en biologie, simples à réaliser mais nécessitant un temps de préparation assez long (plusieurs heures).

L'antibiogramme

L'antibiogramme est la méthode de détermination de la CMI d'un antibiotique la plus utilisée. Cette méthode consiste à ensemencer uniformément et complètement la surface de l'échantillon par la souche à étudier. Puis à y déposer des disques

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

de papiers buvard à une concentration en antibiotique donnée. Il est possible de disposer plusieurs disques sur la surface afin d'observer la reproductibilité de l'action d'une concentration en antibiotique, ou pour tester plusieurs antibiotiques en parallèle. Ces dispositifs sont commercialisés avec leur propres outils de calibration, la teneur d'un antibiotique est unique. La boîte de Pétri contenant le gel, les organismes et les disques d'antibiotique, sont ensuite incubés à une température et une période déterminées selon la souche. La diffusion de l'antibiotique sur la surface gélosée est graduelle et circulaire, elle révèle, après incubation, l'inhibition du développement des organismes à proximité des patchs par une zone vierge circulaire (figure 1.7 p.20). Autour de disques d'un antibiotique les résultats obtenus peuvent différer, ceci est dû à l'hétérogénéité des souches (section 1.3.3 p.35).

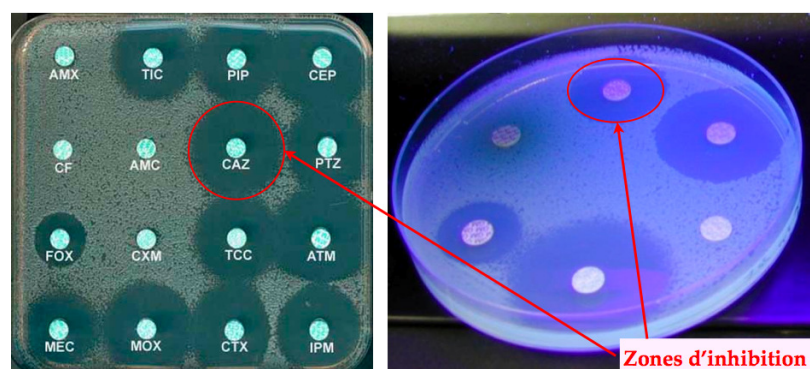


FIGURE 1.7 – Exemples illustrant des résultats d'antibiogrammes. A gauche, boîte carrée (16 tests au maximum) [105]. A droite, boîte ronde (6 tests au maximum) [104].

Le diamètre d'inhibition est relatif à la sensibilité des bactéries au gradient d'antibiotique diffusé dans la gélose. La croissance de la souche est inhibée au contact de la gélose contenant une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Les abaques (un des outils de calibration fournis avec les disques figure 1.8 p.21) déterminent la catégorie clinique des bactéries vis à vis de l'antibiotique utilisé. Ce sont également des instruments permettant d'estimer l'intervalle de concentration comprenant la CMI, par la corrélation avec le diamètre d'inhibition. Dans l'exemple présenté (figure 1.8 p.21) la CMI est donc comprise entre y mg/L et

1.2. Mesure de la CMI

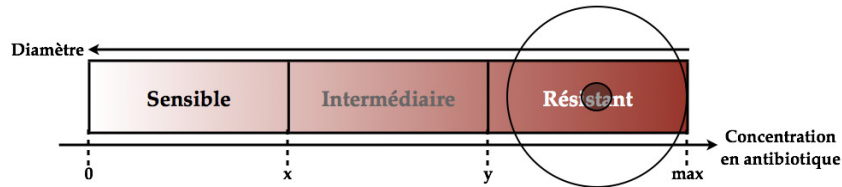


FIGURE 1.8 – Représentation d'un abaque.

la concentration maximale. Il existe une façon plus précise pour déterminer la CMI. Il est possible d'estimer la CMI de l'antibiotique en reportant le diamètre de la zone d'inhibition sur une courbe de concordance. Ces courbes sont préalablement établies, par la société commercialisant les disques, à partir d'une centaine de souche de sensibilités différentes. La mesure du diamètre reporté sur la courbe correspondant à l'antibiotique permet de connaître la CMI de l'antibiotique utilisé sur la souche (figure 1.9 p.21). Si on étudie un antibiotique *A* et que l'on mesure un

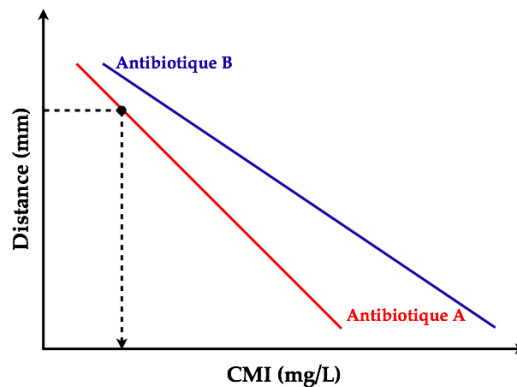


FIGURE 1.9 – Représentation d'une courbe de concordance de la CMI d'un antibiotique avec le diamètre de l'auréole.

certain diamètre, cette courbe permet d'évaluer la CMI du biocide sur la souche bactérienne.

Cette technique est simple et visuelle, mais elle emploie de nombreuses variables, ce qui augmente les erreurs possibles. De plus il faut disposer de la courbe de concordance pour avoir une estimation de la CMI, car l'estimation par les

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

abaques est très vague. Ces courbes de concordance sont produites à partir des mesures par dilution (détaillées en section 1.2.2 p.23). Il existe des machines capables de mesurer les diamètres d'inhibition, et possédant les courbes de calibration en base de données. Ces appareils délivrent directement l'estimation de la valeur de la CMI d'un antibiotique.

l'E-test

Cette méthode est basée sur les mêmes principes que les antibiogrammes par disques. Sur une surface de nutriments gélosée, une souche est ensemencée. Puis cette fois-ci c'est une bandelette qui est déposée sur la surface du gel. Cette bandelette est elle-même un gradient de concentrations d'antibiotique (figure 1.10 p.22). Après incubation l'action d'un antibiotique révèle une ellipse d'inhibition. Cette bande-

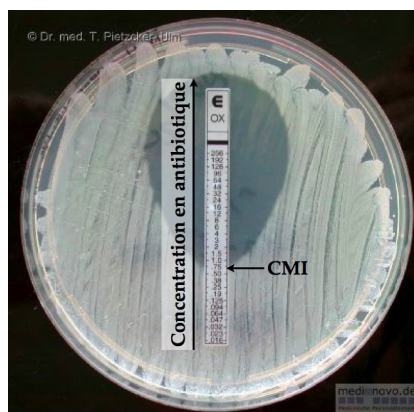


FIGURE 1.10 – Exemple standard d'un E-test [108].

lette indique directement la CMI sans prendre la peine d'employer de nombreuses variables. La valeur de la CMI est lue au niveau de l'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette. Cette méthode est plus précise que la mesure par antibiogramme, elle nécessite moins d'interprétations, mais elle est très onéreuse.

1.2.2 Méthodes par dilution

Ces méthodes déterminent la CMI de façon directe. Elles reposent sur la composition d'un gradient de concentrations d'un antibiotique dilué dans le milieu de culture. Ce procédé nécessite autant d'échantillons et de manipulations que de concentrations à tester (figure 1.11 p.23).

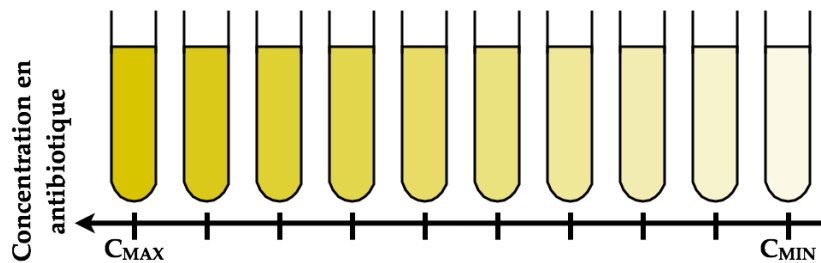


FIGURE 1.11 – Composition d'un gradient dans divers échantillons.

Dilution dans un gel d'Agar

Le principe de cette méthode est d'effectuer une série de dilution d'un antibiotique dans un milieu de culture (figure 1.11 p.23), puis d'en former un gel (d'Agar). La série de boîtes de Pétri ainsi préparées ont toutes une teneur différente en antibiotique. Ensuite l'échantillon est ensemencé en quelques points de la surface par la souche à étudier. C'est un protocole assez long et fastidieux, il existe une machine commercialisée permettant d'ensemencer les surfaces, mais toutes les autres étapes sont à effectuer manuellement. Une fois les échantillons préparés, ils sont incubés à température et période données. Dans l'exemple présenté (figure 1.12 p.24), l'appareil de Steers dispose des organismes sur la surface du gel par des pointes métalliques. Ces échantillons une fois incubés, révèle selon la concentration en antibiotique la résistance ou l'inhibition de la souche. Pour déterminer la CMI il faut préparer un certain nombre d'échantillons à différentes concentrations, et la boîte de Pétri inhibant la croissance correspond à une concentration en antibio-

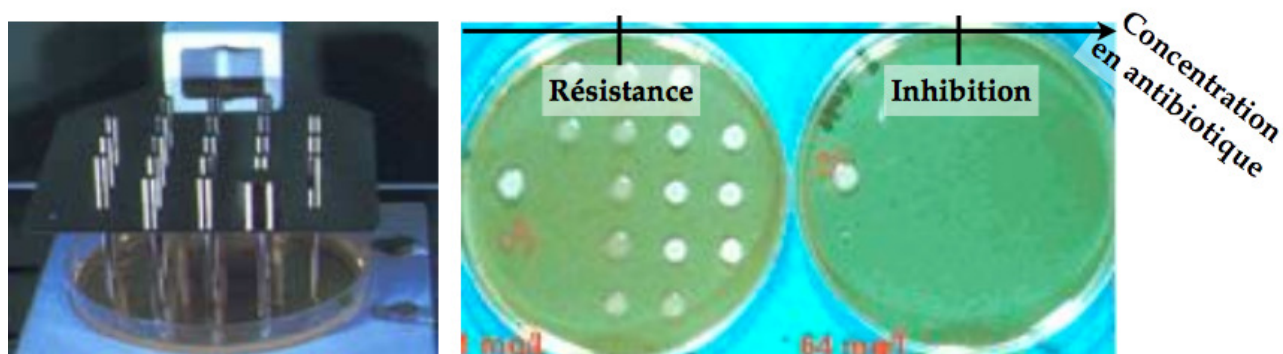


FIGURE 1.12 – Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution dans un gel d'Agar. A gauche, l'appareil de steers, à droite, résultats obtenus [106].

tique qui est la CMI. Cette méthode est la moins pratique de toutes, et elle est très peu utilisée.

Technique de dilution et micro-dilution

Le principe de cette méthode est de réaliser un gradient de concentrations en antibiotique dans une série de tubes (technique de dilution) ou une série de puits d'une plaque à micro-titration (technique de micro-dilution) (figure 1.11 p.23). La technique est la même pour ces deux méthodes, seul le volume de l'échantillon testé diffère. Dans la série d'échantillons est introduite la même densité de cellules à étudiées. Après incubation à température et période fixées les échantillons révèlent l'action de l'antibiotique selon la turbidité des échantillons (figure 1.13 p.25). Lorsque que le biocide est en quantité suffisante elle inhibe la croissance bactérienne. Et au contraire en cas d'insuffisance la population peut se multiplier et le développement des cellules s'observe par un échantillon trouble. La CMI est donc fixée comme la concentration la moins élevée inhibant la croissance à la frontière croissance/inhibition (figure 1.13 p.25).

Ces méthodes sont également fastidieuses pour la préparation des échantillons, mais ce sont les seules permettant d'observer la dynamique de croissance en pré-

1.3. L'effet de l'inoculum

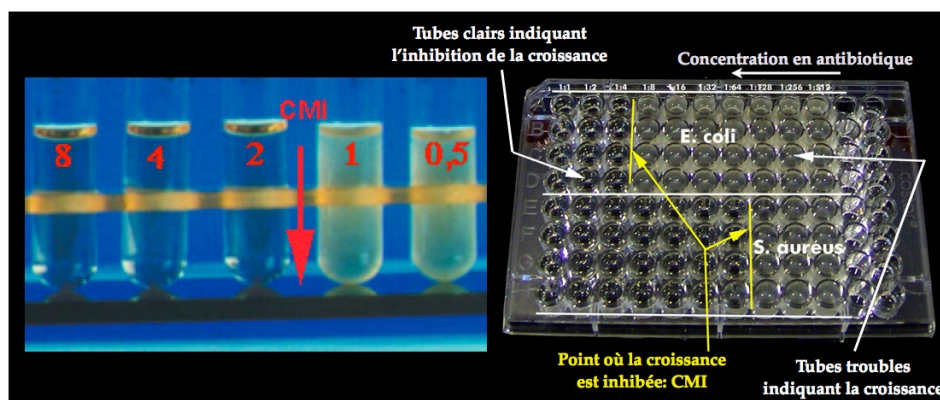


FIGURE 1.13 – Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution en volume. A gauche, test en volume macroscopique [107]. A droite, résultats obtenus en plaque à micro-titration photographie [103].

sence d'antibiotique (lorsque les bactéries peuvent se développer). De plus la micro-titration peut être effectuée par une machine, c'est pour tout cela que cette méthode est fréquemment utilisée.

Les bactéries sont des êtres vivants doués de propriétés diverses parmi lesquelles, la capacité d'élaborer des stratégies d'opposition à l'action des anti-bactériens, et notamment à un sous-dosage. C'est ce qui permet d'observer un point crucial aux études pharmacologiques : la CMI.

Mais la plupart des méthodes de détermination de la CMI sont fastidieuses et surtout de très faible précision. Les méthodes de détermination de la CMI présentées sont techniquement limitées, et limitent de ce fait la résolution des mesures. Ces considérations font état de la nécessité d'élaborer de nouvelles techniques de mesures, ou en tout cas d'améliorer celles existantes.

1.3 L'effet de l'inoculum

La CMI d'un antibiotique définit donc la concentration critique en dessous de laquelle le biocide utilisé n'est pas efficace pour l'inhibition ou l'élimination de

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

micro-organismes. Les nombreuses études de CMI d'antibiotiques sont réalisées sous contrôle constant de certains facteurs expérimentaux, parce qu'il est reconnu que la température et le pH, par exemples, influencent la valeur de la CMI. Et généralement les tests de CMI sont effectués en utilisant une grande densité de cellule, entre 10^6 et 10^8 *cellules/mL*. La taille de l'inoculum est un facteur expérimental pouvant influencer la valeur de la CMI. Cette influence est parfois controversée.

La dépendance de la CMI à la densité initiale de cellules présentes est avérée par la plupart des études. Dans certains cas l'effet sur la CMI lié à l'inoculum est considéré comme un artefact : "un phénomène *in vitro* de laboratoire" [95]. Ils remettent en cause le constat de dépendance entre CMI et taille de l'inoculum mettant en avant l'hypothèse du nul [9, 33]. Hypothèse supposant que la taille de l'inoculum n'a pas d'effet sur la CMI. Ce qui veut dire que peu importe la densité de cellules initialement stressées, la CMI est unique pour un couple inhibiteur/micro-organisme.

Les observations démontrant que la taille de l'inoculum n'a pas d'effet sur la valeur de la CMI de l'inhibiteur utilisé, estiment que le constat de dépendance entre la taille de l'inoculum et la CMI est lié à un facteur de limitation temporelle des expériences [9]. La figure 1.14 (p.27) expose pour chaque courbe l'influence de la densité des organismes sur la CMI. Et la figure révèle trois valeurs distinctes de CMI croissantes au cours du temps pour une seule taille d'inoculum. Ce qui est admis dans ce cas, c'est le fait que des conditions expérimentales néfastes n'affectent que le temps nécessaire à un organisme pour achever sa croissance. En d'autres termes, cela signifie que soumises à n'importe quelles conditions en deçà de la CMI, les cellules achèvent leur croissance après un certain temps d'incubation plus ou moins long selon leur densité initiale. Ceci les amène à penser que tous les inoculums convergent vers une seule CMI, et que la taille n'influence pas cette concentration seuil [9].

Le fait que l'inhibiteur ralentit le taux de croissance des organismes étaye cette théorie du nul [9, 33, 40, 89, 93, 99]. Leur idée est que les expérimentateurs obser-

1.3. L'effet de l'inoculum

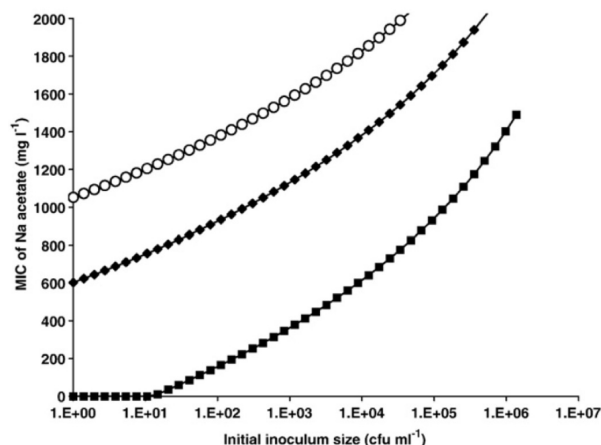


FIGURE 1.14 – Estimation par un modèle de la CMI en fonction de l'inoculum à différents temps d'incubation. Les carrés pleins, après 24h, les losanges pleins, après 48h et les ronds vides après 72h [9].

vant un effet de l'inoculum sur la CMI ne poussent pas leurs expériences jusqu'à leur dénouement. Car un taux de division faible rallonge la phase de croissance des organismes et la phase stationnaire est atteinte beaucoup plus tard. Ainsi, avec initialement peu de cellules en présence d'antibiotique, la saturation est atteinte beaucoup plus tard que lorsqu'initialement est introduit une forte densité de cellules.

Cependant la CMI du couple antibiotique/bactérie révoquant sa dépendance à la taille de l'inoculum n'est pas déterminée, c'est étonnant car cela aurait pu étayer l'hypothèse du nul par une quantification. De plus d'autres études agrément sur le fait que l'inhibiteur est à l'origine d'un taux de croissance faible [40, 89, 93, 99]. Mais ces études démontrent que la CMI est dépendante de l'inoculum. Une étude en particulier montre par la figure 1.15 (p.28) que l'effet de l'inoculum sur la CMI existe après trois semaines de période d'incubation [89]. Et l'étude récusant l'hypothèse du nul, utilise l'acide sorbique comme inhibiteur. Cet acide est un conservateur (E200) antifongique travaillant de concert avec ses sels (les sorbates - E201 E202 E203). L'étude affirmant l'hypothèse du nul utilise également un agent de conservation alimentaire comme inhibiteur, l'acide acétique (E260) et

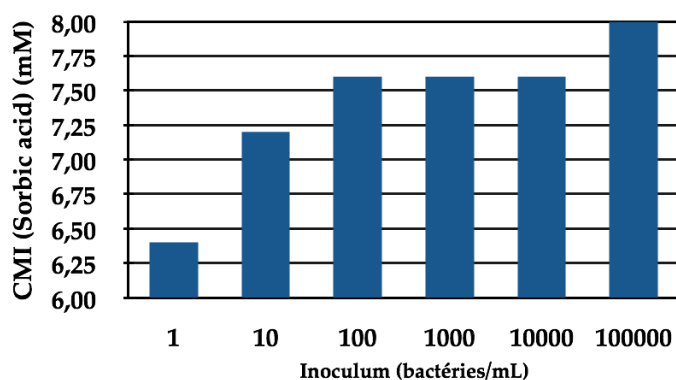


FIGURE 1.15 – Valeurs des CMI pour différents inoculum [89]. Résultats obtenus après trois semaines d'incubation.

plus particulièrement son sel, l'acétate de sodium (E262).

En réalité ces études utilisent les sels pour augmenter la pression osmotique du milieu. Le stress osmotique sur des organismes a pour effet d'inhiber leur croissance. Mais de nombreux organismes sont particulièrement bien dotés pour répondre à ce type d'inhibition et en particulier les souches *E.coli* utilisées pour soutenir l'hypothèse du nul [9]. L'adaptation des micro-organismes aux variations de pression osmotique du milieu environnant repose sur une accumulation de solutés compatibles dans le cytoplasme permettant leur croissance dans un milieu à forte concentration saline. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse ont été intensivement étudiés chez les entérobactéries dont fait partie *E.coli* [81]. Les levures sont plus sensibles au stress osmotique, ce qui amène à penser que les sels utilisés sur *Zygosaccharomyces* [89] sont plus efficace pour l'inhibition que sur *E.coli*. Et permet donc de mesurer une CMI dépendante de l'inoculum.

Ainsi les auteurs avançant l'hypothèse du nul [9] basent leur argumentation sur l'utilisation d'un couple biocide/bactérie, dont les bactéries sont connues pour s'adapter à l'environnement néfaste créé par le biocide. Il n'est pas étonnant de voir cet argument contredit par les résultats produit sous des conditions temporelles

1.3. L'effet de l'inoculum

similaires d'autres auteurs dont les organismes sont moins résistants à ce type de biocide [89]. Il existe donc peut-être des couples biocide(s)/organisme(s) qui ne montrent aucun effet lié à la taille de l'inoculum. Ce que nous apprend [9] c'est que pour valider une hypothèse, il faut mener à terme la croissance pour être certain de connaître le comportement des cellules en présence d'inhibiteur. Et les antibiotiques montrant une meilleure efficacité inhibitrice que les sels sont les composés à utiliser pour observer le comportement bactérien sous des conditions délétères.

En définitive, selon le nombre initial de bactéries, l'action d'antibiotique est subit différemment. L'accroissement de la densité cellulaire initiale augmente la valeur de la CMI d'un antibiotique [7, 65]. Cela signifie qu'il faut une dose minimale en antibiotique plus importante pour éliminer un plus grand nombre d'organismes. En d'autres termes, un groupe d'individus se défend mieux qu'un individu isolé face au stress antibiotique. C'est un comportement qui s'admet aisément. Il existe de nombreuses stratégies défensives permettant aux organismes de résister aux antibiotiques. Si elles sont dépendantes de la taille de la population, elles peuvent expliquer l'effet de l'inoculum sur la CMI.

1.3.1 Quorum-sensing

En premier lieu il est avéré que les bactéries communiquent les unes avec les autres par la production et la détection de signaux chimiques [21, 54, 30, 102]. Ce mode de communication est appelé quorum-sensing. Cela permet aux bactéries de surveiller l'environnement pour leur voisines afin de coordonner les comportements de coopération au niveau de la population. Les informations fournies par ces molécules sont cruciales pour la synchronisation des activités de grands groupes de cellules. A travers l'utilisation de la communication chimique, les bactéries peuvent réguler leur comportements relativement à la densité de la population [54]. En ce qui concerne les fortes densités de cellules, il est reconnu que le quorum-sensing active certains comportements, notamment l'amélioration de la résistance aux an-

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

tibiotiques [21].

Le processus de quorum-sensing est initié lorsque le milieu environnant les organismes atteint une concentration seuil en molécules de communication. Les cellules synthétisent ces composés chimiques nécessaires à la communication, ainsi la densité de cellules influence la quantité de ces molécules synthétisée. Le seuil est donc plus rapidement accessible pour de fortes densités d'organismes. C'est pourquoi le quorum-sensing est considéré comme improductif lorsqu'il est exercé par un individu agissant seul, et devient bénéfique lorsqu'il est effectué par un grand nombre de cellules.

De récents travaux démontrent par le confinement de cellules, que les organismes seuls sont capables d'initier le quorum-sensing [11]. Le confinement en goutte réduit le volume extracellulaire, mais n'influence pas la production de signaux chimiques, ce qui augmente la concentration produite par un faible nombre d'organismes et permet d'atteindre la concentration seuil, à l'échelle de la cellule unique, plus rapidement que lorsque l'expérimentation se déroule dans un puits. Car dans un puits le volume est beaucoup plus important (environ 10^4 fois plus) et cela dilue les composés chimiques produits. L'initiation du quorum-sensing reste tout de même très variable à cette échelle de population. La figure 1.16 (p.30) in-

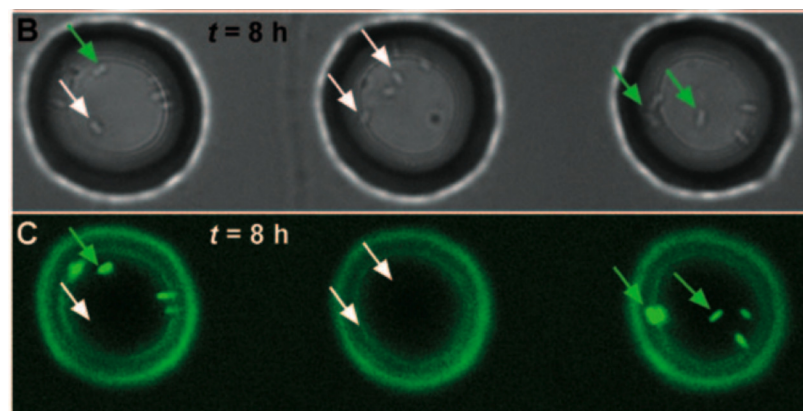


FIGURE 1.16 – Photographies sous lumière blanche (B) et par fluorescence (C) de trois gouttes adjacentes révélant la synthèse de molécules initiant le quorum-sensing [11].

1.3. L'effet de l'inoculum

dique par des flèches vertes les cellules initiant le quorum-sensing et par des flèches blanches celles qui sont inactives. La variabilité de l'expression de la communication chimique est un effet supplémentaire à l'improductivité du quorum-sensing à l'échelle de la cellule unique. Il est tout de même initiabile à cette échelle. Et, relativement au volume du milieu de culture, il faut pouvoir survivre à l'attaque des antibiotiques suffisamment longtemps pour pouvoir atteindre la concentration seuil.

En définitive, il est clairement défini que pour de fortes concentration en organismes le quorum-sensing influence la résistance aux antibiotiques. La communication ne permet pas de résister aux antibiotiques, elle permet de coordonner l'action d'un groupe d'organismes. Si on imagine que les bactéries possèdent un mode de résistance, on peut envisager que le quorum-sensing coordonne la population bactérienne afin d'activer leur mode d'action de résistance aux anti-bactériens. Concernant les faibles densités de cellules, le quorum-sensing peut être initié si la concentration seuil en signaux chimique est atteinte avant l'élimination. Ainsi, la résistance est plus ou moins efficace selon la densité d'organismes et selon la cinétique d'action d'un antibiotique. Quoiqu'il en soit, le quorum-sensing influence la résistance, donc peut faire varier la CMI selon la taille de l'inoculum.

1.3.2 Destruction du biocide

Les organismes ont différentes stratégies de défense contre l'attaque des antibiotiques (figure 1.17 p.32). Ils peuvent éjecter les antibiotique ou bien synthétiser des enzymes capables d'effectuer différentes tâches. Les enzymes peuvent protéger la cible directement ou en synthétisant une cible non vulnérable. La défense des micro-organismes réside également dans leur capacité à attaquer les agents inhibiteurs. Ils sont effectivement capables de développer des mécanismes voués à la destruction des biocides. On peut donc supposer que plus les organismes se trouvent en nombre plus ils sont aptes à détruire les inhibiteurs. De ce fait si

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

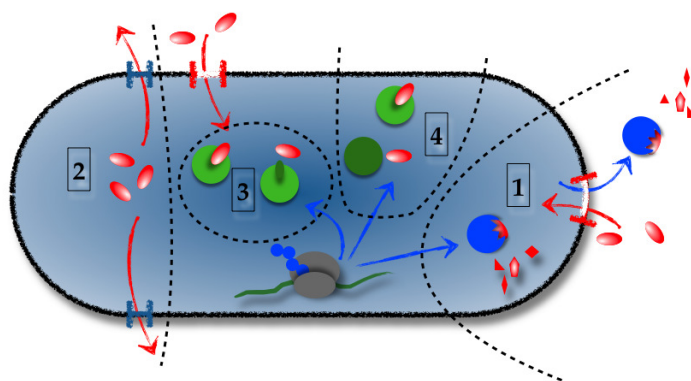


FIGURE 1.17 – Représentation des stratégies de défense d'un organisme. 1 : Destruction de l'antibiotique - 2 : Expulsion par les pompe Efflux - 3 : Protection de la cible - 4 : Substitution de la cible.

l'inoculum influence la destruction des biocides, il peut influencer par ce mode de défense la CMI d'un inhibiteur.

Tout d'abord une étude [89] propose d'incuber différents inoculum d'une levure en présence de la même concentration initiale en inhibiteur. Le dosage de l'acide sorbique après quatre semaines révèle la perte en inhibiteur (figure 1.18 p.32). Cette

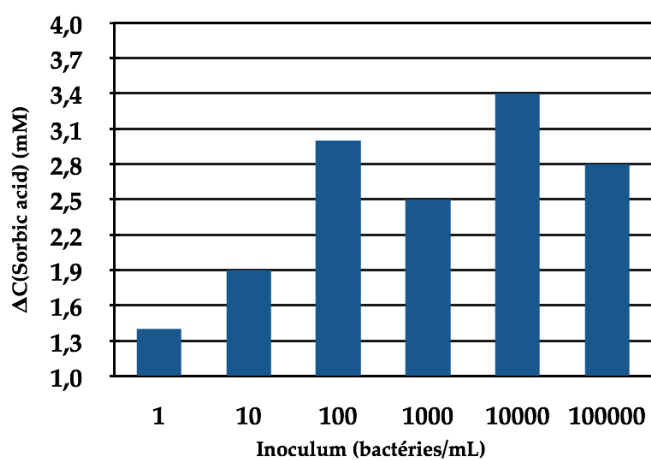


FIGURE 1.18 – Perte en inhibiteur après quatre semaines d'incubation. Report des valeurs de la table 1 de [89].

1.3. L'effet de l'inoculum

étude montre que plus l'inoculum est important, plus la perte en sel est élevée. Ainsi, il est démontré empiriquement qu'une forte densité initiale de cellules permet la destruction du biocide plus efficacement qu'un faible inoculum. La proportion de la perte en sel indique, en tout cas, que les cellules limitent le métabolisme du biocide, et cela relativement à leur nombre initial.

En ce qui concerne les traitements anti-bactériens, les bactéries sont aussi naturellement capables de se défendre en synthétisant, par exemple, des enzymes qui hydrolysent des antibiotiques [26, 78, 95]. Ces bactéries produisent comme enzyme la β -lactamase qui hydrolyse le cycle β -lactame suivant la figure 1.19 (p.33) désactivant ainsi la propriété antibiotique de la molécule.

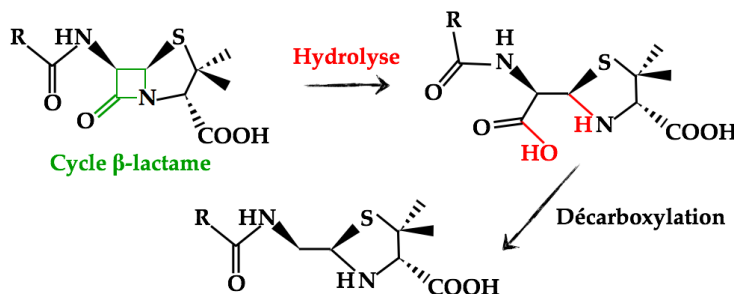


FIGURE 1.19 – Hydrolyse d'une molécule de pénicilline par des β -lactamases.

Les progrès techniques permettent d'élaborer des organismes mutants, auxquels il est donné la capacité de produire plus facilement de la β -lactamase, concevant ainsi des organismes très résistants aux antibiotiques β -lactames. Les mutations confèrent donc un haut degré de résistance des organismes aux biocides utilisés. Ainsi, ce type de souches résistantes contre un antibiotique sont des outils de mesure de l'effet de l'inoculum sur la CMI par l'hydrolyse des biocides (figure 1.20 p.34).

Tout d'abord les résultats (figure 1.20 p.34) démontrent l'effet de l'inoculum

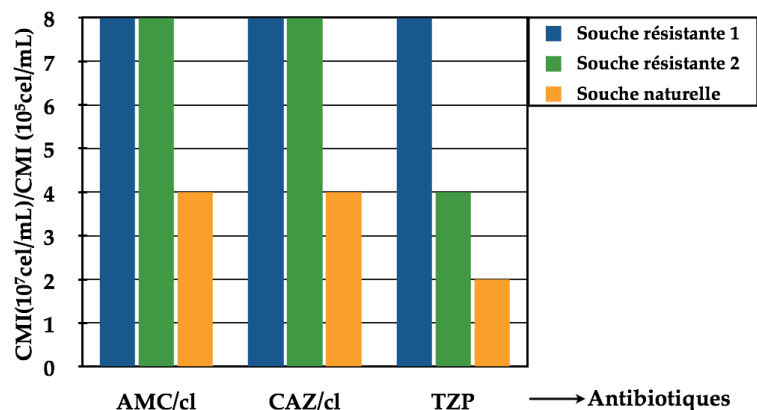


FIGURE 1.20 – Report des valeurs de table 2 et table 4 de [7]. Ratio des mesures de CMI de deux inoculums : $CMI_{10^7 \text{ cellules/mL}}/CMI_{10^5 \text{ cellules/mL}}$ en fonction de différents antibiotiques.

sur la CMI de différents antibiotiques. Effectivement, on a pour tous les cas :

$$CMI_{10^7 c/mL} > CMI_{10^5 c/mL}$$

Une forte densité initiale de cellules implique l'augmentation de la valeur de la CMI. Et la figure 1.20 (p.34) établit également que l'effet de l'inoculum sur la CMI est plus prononcé pour les organismes mutants que pour les cellules "naturelles" [7]. Ces résultats (figure 1.20 p.34) révèlent que :

$$\frac{CMI_{10^7 c/mL}^{\text{mutants}}}{CMI_{10^5 c/mL}^{\text{mutants}}} > 2 \cdot \frac{CMI_{10^7 c/mL}^{\text{naturels}}}{CMI_{10^5 c/mL}^{\text{naturels}}}$$

Ainsi l'effet de l'inoculum sur la CMI peut être attribué à l'hydrolyse des antibiotiques. En effet, si l'hydrolyse n'avait pas d'impact, on peut supposer que le seul effet des mutations serait d'augmenter la résistance des organismes et donc les

1.3. L'effet de l'inoculum

valeurs des CMI pour chaque inoculum, mais pas le ratio. On aurait donc :

$$\frac{CMI_{10^7c/mL}^{mutants}}{CMI_{10^5c/mL}^{mutants}} \simeq \frac{CMI_{10^7c/mL}^{naturels}}{CMI_{10^5c/mL}^{naturels}}$$

Même si l'effet de l'inoculum est observé pour tous les antibiotiques β -lactames testé, il existe un effet de classe des β -lactames [93]. Cela signifie que certains antibiotiques sont moins efficaces que d'autres car plus faciles à hydrolyser. Donc l'effet de l'inoculum par hydrolyse est un mécanisme complexe combinant la capacité des micro-organismes à libérer une enzyme [26] à la force de l'antibiotique.

Les analyses des données montrent que l'hydrolyse du biocide dépend fortement de la taille de l'inoculum, et de ce fait, influence la valeur de la CMI, car plus il y a de cellules en volume, plus l'hydrolyse sera importante. Les organismes mutants aident à amplifier ce mécanisme de résistance mais les organismes naturels possèdent également la capacité de se défendre par hydrolyse. Ainsi ce mode de défense des organismes peut expliquer la relation de dépendance entre la CMI et la densité initiale de cellules.

1.3.3 Variabilité phénotypique

L'exposition d'une population homogène à un traitement antibiotique fort est sensé éliminer la souche bactérienne soumise au stress. Pourtant il existe fréquemment une sous-fraction d'organismes résistants présents au sein d'une population. De cette manière, une souche bactérienne peut survivre à de fortes contraintes, tel qu'un traitement antibiotique. Ces organismes très résistants sont à l'origine du développement d'une population en présence après traitement antibiotique(s) [38]. Contrairement à des mutants résistants aux inhibiteurs, une grande partie de ces cellules restent sensibles à un traitement antibiotique après ré-incubation. Ce phénomène est appelé persistance [4, 69, 62] et est démontré dans la figure 1.21 (p.36). Des bactéries se développent dans un premier temps en milieu de culture. Après

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

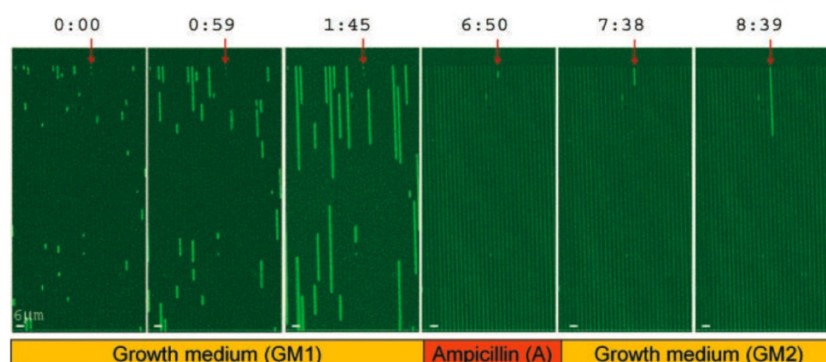


FIGURE 1.21 – Démonstration du phénomène de persistance [4] par une expérience d'élimination d'*E. coli* par l'ampicilline.

un certain temps d'incubation (6h50) elle sont soumise à un traitement antibiotique. Le biocide élimine pratiquement tous les micro-organismes, seules quelques bactéries survivent. On note d'ailleurs que pendant le phase de croissance de la majeure partie de la population, ces souches résistantes ne se développent pratiquement pas. L'analyse de l'histoire des survivantes révèle qu'elles ont un taux de croissance très faible par rapport aux taux de croissance de cellules "normales" [4, 69, 62]. Elles se développent normalement lorsqu'elles sont nourries à nouveau.

La persistance est donc liée à la pré-existence d'hétérogénéité au sein d'une population bactérienne. Ces bactéries n'acquièrent pas génétiquement une résistance à l'antibiotique, contrairement aux mutants. Elles se trouvent dans un état de dormance. Ce qui s'oppose, encore une fois, aux cellules résistantes mutantes, qui se développent même sous stress antibiotique (figure 1.22 p.37). L'état de dormance, est un état quasi-stationnaire développé par les micro-organismes comme garantie de survie de l'espèce en cas de soumission à un stress [62].

Les cellules persistantes sont continuellement générée pendant le développement cellulaire (figure 1.23 p.37). Ce phénomène peut expliquer l'effet de l'inoculum sur la CMI car le "stockage" d'assurances-survie se fait en coordination avec la croissance. La croissance étant un phénomène exponentiel, la part de cellules

1.3. L'effet de l'inoculum

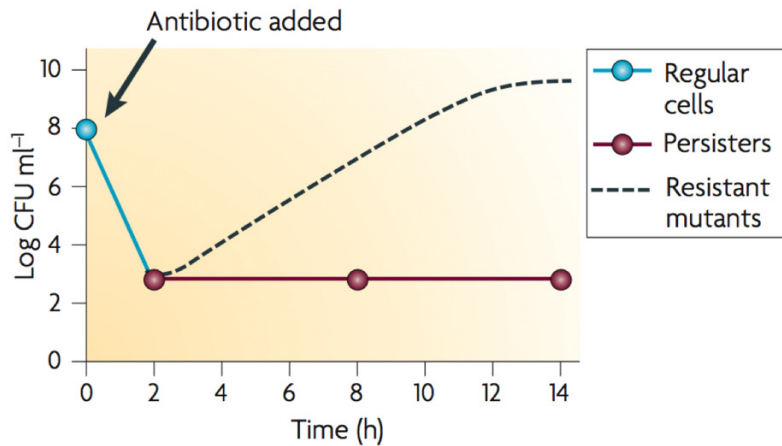


FIGURE 1.22 – Comparaison des différents comportements d'organismes "normaux" (regular cells), persistants (persisters) et mutants résistants lors d'une désinfection antibiotique [69].

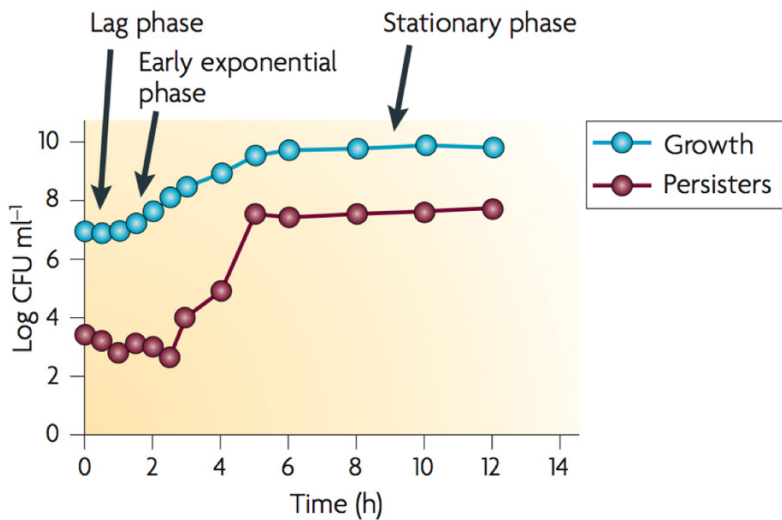


FIGURE 1.23 – "Stockage" de cellules persistantes pendant la croissance [69].

persistantes augmente de façon drastique en parallèle à la croissance de toute la population.

Ainsi les organismes persistants se développent tout au long de la croissance comme garantie de survie d'une population. Un inoculum étudié contient d'autant

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

moins de cellules persistantes qu'il est dilué. De cette façon la disparité initiale du nombre de persistants contribue à l'effet de l'augmentation de la CMI avec l'augmentation de la taille de l'inoculum.

1.3.4 L'altruisme bactérien

Lorsqu'un traitement antibiotique est inefficace sur une colonie on peut s'attendre à ce que les souches initialement résistantes survivent et constituent à terme majoritairement la colonie, alors que les autres souches plus faibles disparaissent. Les travaux effectués révèlent qu'en l'occurrence les souches résistantes ne profitent pas de la vulnérabilité des autres souches pour investir le milieu de culture [66]. En réalité, ces organismes résistants sécrètent de fortes quantités d'une molécule nommée indole, au dépend du bon déroulement de leur développement. Cette molécule, induisant la détoxification des cellules, est sécrétée afin d'aider la tolérance des organismes faibles aux stress.

Une population d'*E.coli* en l'absence de stress prospère et sécrète naturellement l'indole (figure 1.24.a p.39). Puis sous des conditions de stress antibiotique sévère les organismes morts ou sur le déclin ne produisent plus l'indole en quantité suffisante (figure 1.24.b p.39). La présence d'un organisme mutant résistant à l'antibiotique est capable de maintenir sa production d'indoles, permettant la résistance des organismes plus faibles à l'action de l'antibiotiques (figure 1.24.c p.39). Ce mécanisme n'est pas propre à un seul antibiotique.

Cette action démontre un mécanisme communautaire au dépend même des molécules assez fortes pour survivre. Ceci établit une forme de sélection de parentèle, théorie expliquant comment les comportements altruistes chez les animaux et micro-organismes favorisent le sacrifice de quelques uns pour la survie du groupe.

Par ailleurs, lors de ces expériences, il est exposé le fait que la CMI des individus ne permet pas de prédire la CMI du groupe (figure 1.25 p.39). En effet, au cours du temps, les mutants confèrent au groupe la possibilité de résister à des doses

1.3. L'effet de l'inoculum

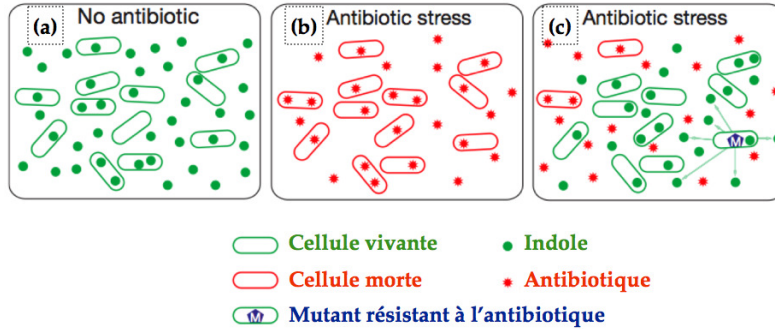


FIGURE 1.24 – Principes du mécanisme d'aide à la résistance [66].

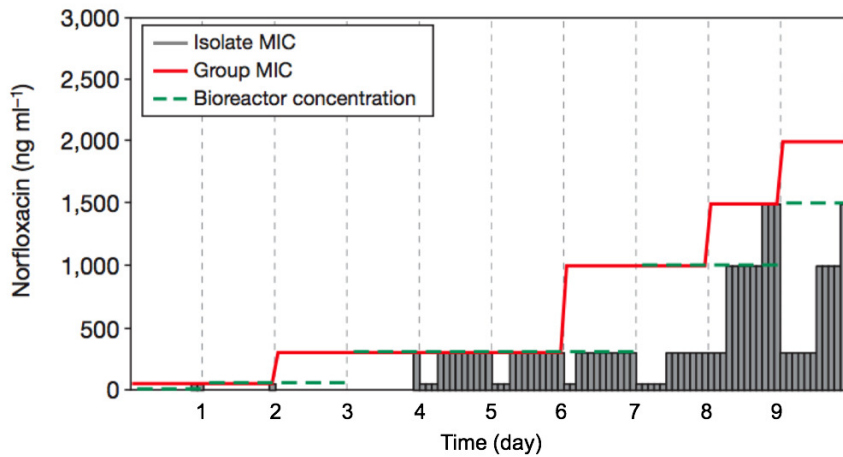


FIGURE 1.25 – Evaluation des CMI de groupes et d'individus au cours du temps [66].

croissantes d'antibiotiques. Et individuellement la majorité de la population est incapable de résister à ces doses d'antibiotiques. Par exemple, au bout du troisième jour, la CMI du groupe est autour de 250 ng/mL , alors qu'elle peine à atteindre 50 ng/mL pour les individus isolés.

Ce qui amène à conclure que l'effet de parentèle est également un facteur à l'origine de l'effet de l'inoculum sur la CMI. Car les individus altruistes sont en plus grande proportion dans des larges inoculums que dans les faibles. Donc un plus grand nombre d'individus est apte à aider ses congénères ce qui a pour effet probable d'augmenter la CMI avec la taille de l'inoculum.

1.3.5 Le biofilm protecteur

Un biofilm est une population de cellules poussant sur une surface et enfermée dans une matrice exopolymère extracellulaire [68, 69, 90] (figure 1.26 p.40). Au sein d'un biofilm les organismes poussent en amas [59]. La résistance aux biocides se distingue par des biofilms, qui sont la cause majeure d'infections. Ils sont certainement responsable de 65% de toutes les infections bactériennes recensées [13, 69]. Les bactéries au sein d'un biofilm sont très bien protégées des contraintes exté-

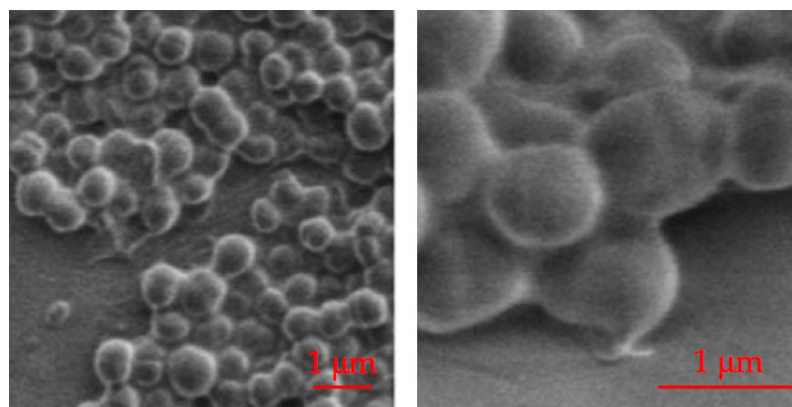


FIGURE 1.26 – Photographies MEB de biofilms de *S. epidermidis* à différentes échelles [67].

rieures. D'ailleurs c'est la fonction de base de la couche protectrice. La formation d'un biofilm résulte d'une organisation défensive en présence d'antibiotique [47]. Des tests ont démontré que les bactéries au sein d'un biofilm survivaient à une exposition en antibiotique de concentration de cent à mille fois la CMI des mêmes bactéries en suspension [90]. De plus, même soumis à un fort cisaillement ces biofilms sont capables de se développer sur des surfaces (figure 1.27 p.41). S'ajoute à cela le fait que les cellules libérées d'un biofilm vers le milieu de croissance sont considérablement plus résistantes que des cellules en suspension, mais deviennent néanmoins moins robustes que celles présentes dans le biofilm [13]. Tout ceci démontre le potentiel de protection des biofilms. Les raisons du fort potentiel à la résistance impliquent différents phénomènes combinés. Tout d'abord la "pénétra-

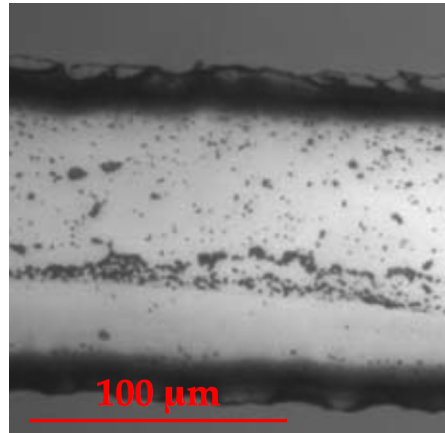


FIGURE 1.27 – Biofilms de *S. epidermidis* soumis à d'importants cisaillements [67].

bilité" de la couche polymère. Les biofilms sont formés d'une matrice qui peut limiter la diffusion de substances à travers elle, et de surcroît cette matrice est capable d'adsorber les antibiotiques. Mais la physico-chimie de cette matrice n'est qu'un premier rempart à franchir pour éliminer les bactéries. En effet associé à cette barrière efficace, les études révèlent d'autres obstacles rendant la désinfection difficile :

- Le quorum-sensing. Il est requis pour la formation de la matrice [13] et pour la coordination de la défense de la population.
- La destruction des antibiotiques par les bactéries. Elle est d'autant plus efficace avec la diffusion retardée des biocides à travers la membrane [13].
- La persistance. Les biofilms produisent plus de cellules persistantes que les organismes en suspension [47, 68, 69].

Ces phénomènes multiples combinés à la physico-chimie d'une membrane favorable à la défense, permet de définir les biofilms comme facteurs de résistance aux antibiotiques. La taille de l'inoculum influence la densité des biofilms et peut avoir, de ce fait, une influence sur le comportement de la dépendance à la CMI.

1.3.6 Dépendance entre la CMI et l'inoculum

Il est reconnu que la taille de l'inoculum influence la CMI d'un antibiotique. Cette concentration est la définition un sous-dosage dont l'origine réside dans la capacité des organismes à élaborer des stratégies défensives. Tous ces comportements de défense envers les antibiotiques sont tributaires de la taille de l'inoculum sujet au stress.

D'autres examens permettent de décrire le comportement de dépendance entre l'inoculum et la CMI. En premier lieu, la description de l'augmentation de la valeur de la CMI rapporte qu'elle se fait de façon brutale lorsque la taille de l'inoculum augmente [99]. On observe sur la figure 1.28 (p.42) que l'augmentation de la CMI

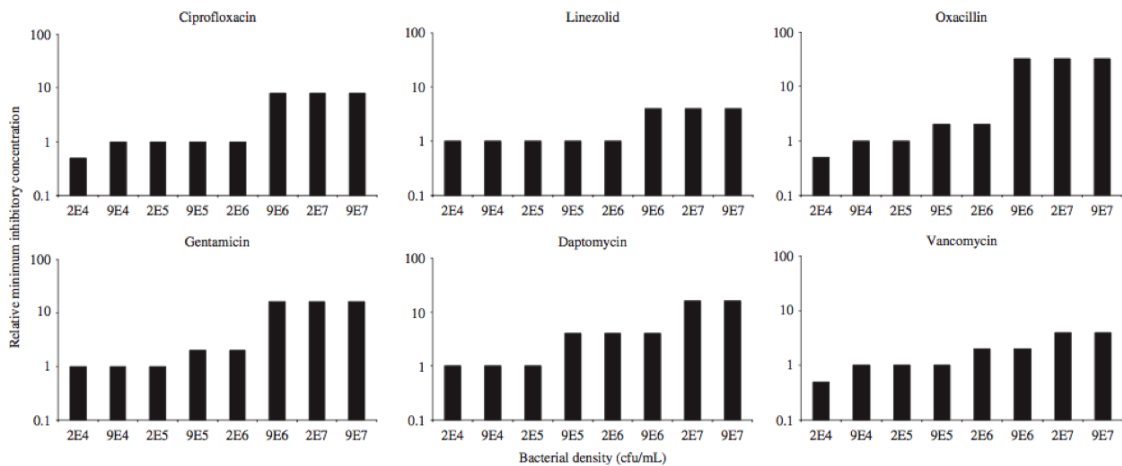


FIGURE 1.28 – Valeurs de CMI en fonction de l'inoculum pour différents antibiotiques [99].

en fonction de la taille de l'inoculum ne se fait pas de façon continue mais par palier (également observable figure 1.15 p.28). L'origine d'une telle réponse réside dans les techniques couramment employées, qui limitent la quantification précise d'une CMI par la résolution en concentration en antibiotique. La détermination de la CMI par ce type d'expérimentation laisse supposer qu'elle n'est pas forcément égale à la concentration en antibiotique réelle qui inhibe les organismes. Mais

qu'elle donne un ordre de grandeur.

Une méthode d'estimation précise de la CMI permet d'évaluer exactement l'influence de la densité de cellules initialement présentes. L'étude de la dynamique de croissance sous antibiotique et la modélisation des résultats par une courbe tendance permet d'estimer numériquement la CMI [64]. Cette méthode s'affranchit des faibles résolutions des instruments et permet de déterminer précisément la CMI. La dépendance de la taille de l'inoculum en fonction de la CMI est donc déterminée empiriquement. Et la discontinuité est infirmé par l'observation de l'action d'un antibiotique sur un organisme [63]. On constate que dans ce cas (figure 1.29 p.43) que la relation entre la taille de l'inoculum et la CMI est continue. Elle

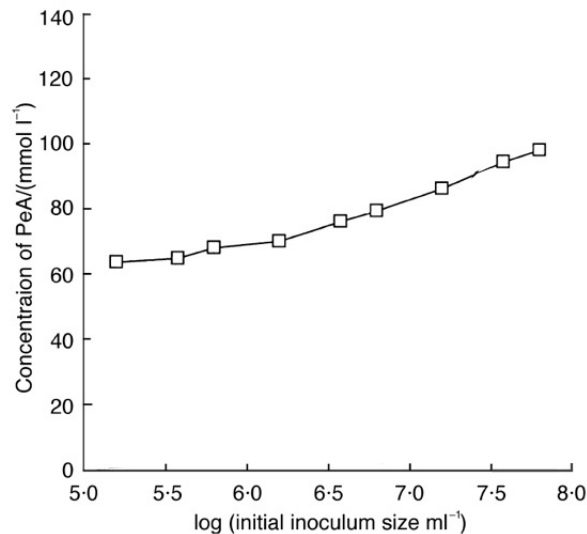


FIGURE 1.29 – Comportement de la CMI par l'alcool phenethyl (PeA) en fonction de la taille de l'inoculum de *Staph. aureus* [63].

semble même linéaire, par une relation logarithmique de la CMI en fonction de l'inoculum, n_i :

$$CMI \propto \log(n_i)$$

Spontanément on pourrait supposer que la dépendance entre la CMI et la den-

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

sité d'organismes se fait de manière linéaire : pour tuer dix fois plus d'organismes il faut dix fois plus d'antibiotiques. Mais ce n'est pas le cas, la modélisation des méthodes classiques de mesure permettent d'estimer une relation logarithmique entre la CMI et la taille de l'inoculum. Et ce comportement peut expliquer pourquoi la CMI est parfois décrite comme indépendante de l'inoculum. En représentant la

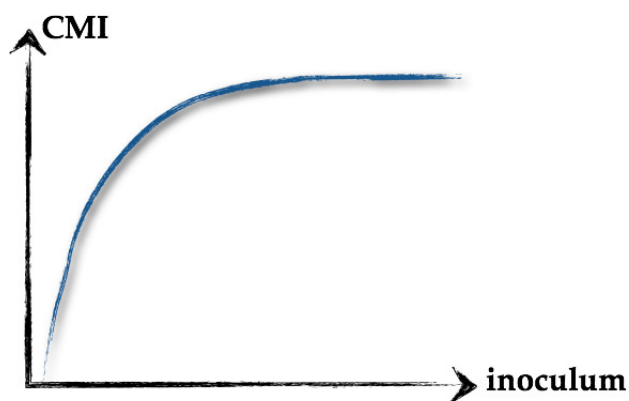


FIGURE 1.30 – Représentation de la dépendance de la CMI en fonction de l'inoculum.

CMI en fonction de l'inoculum par la relation logarithmique, on note la saturation de la CMI aux densités de population élevées (figure 1.30 p.44). Cette "saturation" explique pourquoi l'influence de l'inoculum sur la CMI est controversé. La plupart des études se faisant à hautes densités cellulaires, elles se trouvent certainement dans le plateau de la dépendance de la CMI en fonction de l'inoculum.

Conclusion

Sans contraintes, les micro-organismes commencent leur développement après s'être adaptés à leur nouveau milieu. La croissance est réalisée par division cellulaire à intervalle constant. Après épuisement des ressources nutritives la croissance s'arrête et les organismes se trouvent dans un état stationnaire. Ce modèle théorique de la croissance est perturbé dès l'application d'une contrainte extracellulaire.

Les antibiotiques ont un effet plus que perturbateur de la croissance. Ils sont capables de l'inhiber, ou de l'annihiler. Cette propriété des antibiotiques a ouvert un champs d'investigation : les études pharmacodynamiques. Elles testent *in vitro* l'action des antibiotiques dans le but de concevoir des traitements curatifs contre des agents pathogènes. Les micro-organismes sont testés afin de connaître leurs propriétés défensives et les limites de ces défenses. La CMI est le premier paramètre permettant de définir l'efficacité *in vitro* d'un antibiotique. Elle définit la concentration nécessaire et suffisante traitant une infection bactérienne. Cependant, les méthodes existantes la mesurant sont très faiblement résolues.

Cependant, les travaux réalisés découvrent, pour la plupart, que la valeur de la CMI d'un antibiotique agissant sur une population bactérienne dépend de la taille initiale de cette population. Ils révèlent tous que l'action du biocide réduit le taux de croissance des organismes. Il faut noter que les méthodes de mesures employées ne révèlent pas forcément un effet considérable liant la taille de l'inoculum et la CMI.

La dépendance de la CMI à la taille de l'inoculum est due à trois phénomènes :

- La destruction des antibiotiques par les organismes.
- La persistance des organismes.
- La sélection de parentèle des organismes.

Ils sont suppléés par la formation de biofilms "super-protecteurs", le tout coordonné par la communication inter-cellules : le quorum-sensing. Tous ces facteurs

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

sont à l'origine du comportement de dépendance observé. En effet, toutes ces actions, souvent considérées agissant au mieux par couple, semblent être déclenchées par les organismes pour survivre à l'éradication. En premier lieu le quorum-sensing permettant la coordination des actions, notamment la formation de la matrice exopolymère, à l'intérieure de laquelle les organismes sont bien protégés. Puis la synthèse chimique détruisant les antibiotiques, ainsi que sur le stockage de cellules persistantes assurant la pérennité de la population. Sans oublier les cellules altruistes, qui actionnent la production de composé chimique permettant la défense communautaire.

Quoiqu'il en soit, ces modes de défenses sont considérés comme étant tous influencés par la densité de micro-organismes. De ce fait la combinaison de tous influence la concentration en biocide nécessaire à l'élimination d'une infection bactérienne. L'importance thérapeutique et industrielle de la quantité nécessaire et suffisante d'un biocide pour éliminer une infection, contribue à étudier la façon dont la CMI et la taille de l'inoculum dépendent l'un de l'autre. Le fait de pouvoir connaître cette dépendance éviterait lors de la médication le sur-dosage d'antibiotiques. Et ainsi pourrait limiter l'émergence de bactéries "super-résistantes".

Les premières analyses révèlent que la CMI ne dépend pas linéairement de la taille de l'inoculum. L'étude de la corrélation entre la CMI et la taille de l'inoculum semble être difficile à mettre en place par les méthodes de détermination de la CMI existantes. En effet, les méthodes sont toutes fastidieuses à mettre en place. Celles par diffusion, et en particulier les antibiogrammes, se révèlent être très peu précises. Les méthodes par dilution s'avèrent plus adaptées, hormis les dilutions dans un gel d'Agar, cette dernière est la plus fastidieuse et la moins précise de toutes les méthodes.

Ces considérations permettent de définir le cadre dans lequel s'inscrivent les travaux développés durant cette thèse. La tâche consistera à étudier l'effet de

1.3. L'effet de l'inoculum

l'inoculum sur la CMI, en commençant par l'élaboration d'un nouvel outil de mesure de la CMI d'un antibiotique sur un organismes.

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Chapitre 2

Milli-fluidique et microbiologie

Dans ce chapitre, nous allons introduire les concepts et techniques de micro-fabrications, ainsi que leurs applications en microbiologie. Ensuite nous démontrerons l'intérêt de concevoir des micro-procédés produisant des gouttes. Nous établirons les principes de conception et d'utilisation des gouttes comme des bio-réacteurs. Puis nous introduirons une branche de la micro-fluidique : la milli-fluidique. Ce domaine est apparenté aux micro-fabrications, mais à une échelle de tailles supérieures. La milli-fluidique sera la technologie employée pour instrumentaliser les mesures produites dans cette thèse.

2.1 La microbiologie explorée avec des outils miniaturisés

"Une grande partie de la biologie est basée sur des données qualitatives. En microbiologie, la plupart des techniques utilisées n'ont pas été conçues en pensant à la reproductibilité ou la quantification. Le développement de techniques pouvant faciliter l'acquisition et l'analyse quantitative de données, accélérera la compréhension de la microbiologie. Cela finira par transformer la microbiologie, considérée comme une discipline en grande partie descriptive, en une science fondamentalement prédictive." [70, 109].

La plupart des techniques étudiant les micro-organismes n'ont pas changé de manière significative depuis leur développement initial. De nouveaux outils apportent de nouvelles capacités à la recherche scientifique. Par exemple, en microbiologie les techniques génétiques ont révolutionnées la compréhension des micro-organismes, en rendant possible la manipulation et l'étude des génomes.

La détermination de la CMI d'un antibiotique s'inscrit dans ces considérations. Même si la CMI quantifie une limite en dessous de laquelle l'inhibition par l'antibiotique ne s'opère pas, on a pu voir que cette quantification est limitée (section 1.2.2 p.25). Elle permet plutôt d'apprécier une gamme de concentration inhibant

2.1. La microbiologie explorée avec des outils miniaturisés

la croissance d'un organisme, ce qui s'apparente fortement à une estimation qualitative. Les outils mesurant la CMI n'ont pas progressé depuis leur essor. Tout ceci motive le travail de thèse visant à développer un nouvel outil de mesure contribuant à la mesure de la CMI et à étudier de l'effet de l'inoculum sur cette CMI.

Lors des deux dernières décennies les concepts de miniaturisation ont été appliqués aux domaines d'analyses biologique et chimique. Le coût des réactifs et le temps requis par les tests peut être considérablement réduit par la miniaturisation [56]. Ces caractéristiques ont permis le développement d'applications via des technologies micro-fluidiques de laboratoire sur puces. La micro-fluidique est décrite comme le domaine d'étude et de développement de systèmes qui manipulent, traitent et contrôlent des petits volumes de fluides [6, 50]

2.1.1 Concordance des échelles de tailles

Les micro-fabrications ont un fort potentiel en tant que technologie à employer dans le développement de nouveaux outils permettant des mesures quantitatives en microbiologie. Un outil, ainsi défini, est envisagé comme un réseau de canaux. Les techniques de micro-fabrication sont employées pour construire la structure des canaux dans un matériau. La taille de ces structures varient typiquement du micromètre à plusieurs centaines de micromètres. Selon leurs tailles, ces canaux servent d'enceinte ou de voies de liaisons vers ou entre différentes enceintes.

En se référant aux dimensions caractéristiques de la plupart des composés microbiologiques (table 2.1 p.52), on note que l'échelle de taille des structures s'applique particulièrement bien aux études microbiologiques.

En effet ces considérations permettent d'envisager la manipulation individuelle des cellules et surtout leur environnement extracellulaire direct. Les systèmes robotisés, utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour le criblage de composés chimiques en microplaques, ont permis une réduction de la taille des échantillons analysés jusqu'à des volumes de l'ordre du microlitre et à des cadences d'environ

Chapitre 2. Milli-fluidique et microbiologie

ÉLÉMENTS	TAILLE
Diamètre de l'hélice d'ADN	2 <i>nm</i>
Épaisseur de la membrane cellulaire	10 <i>nm</i>
Virus de grande taille	100 <i>nm</i>
Cellules procaryotes	1-10 μm
Mitochondrie	3 μm
Cellules eucaryotes	10-30 μm

TABLE 2.1 – Tailles de cellules et constituants cellulaires [92].

un test par seconde en plaques à microtitration. Mais cette technologie est sur le point d'atteindre ses limites. Les changements d'échelle liés à la diminution des volumes font apparaître des barrières : le fait que les systèmes mécaniques tels que les robots ne sont pas facilement miniaturisables, et d'autre part, que la manipulation des liquides à des échelles sub-millimétriques est limitée par l'évaporation rapide des liquides. Il est donc clair que seul un changement technologique permettra de franchir le pas de la miniaturisation [6]. De cette façon, les micro-fabrications permettent de se focaliser encore plus sur l'objet à étudier en s'affranchissant de ces contraintes.

Les résultats de mesures biologiques à l'échelle macroscopique sont le produit d'un groupe d'individus. De ce fait les mesures effectuées à ces échelles sont globales : elles intègrent une multitude d'effets individuels. L'harmonie des tailles caractéristiques entre les enceintes et les composés biologiques permettra de mesurer l'effet d'un individu seul, ou un petit groupe. Les micro-fabrications offriront donc l'opportunité de savoir comment s'intègre la part individuelle à un signal global [70].

Les micro-technologies sont caractérisées par l'assemblage d'une multitude de canaux. Ce qui permet de construire un outil dans lequel des milliers d'expériences en parallèles (ou en séries) peuvent être effectuées sous des conditions contrôlées, à l'échelle d'un petit groupe d'organismes.

2.1. La microbiologie explorée avec des outils miniaturisés

2.1.2 La micro-fabrication

Un grand nombre de questions en microbiologie pourront bénéficier du développement de ce type d'outils (section 2.1.3 p.55), mais de multiples innovations technologiques sont nécessaires pour atteindre ces buts.

Technique

Dans le domaine de la micro-fabrication, les techniques de lithographie douce sont les plus répandues. Elles permettent de concevoir des structures de manière simple et peu coûteuse. Ces méthodes ont pour principe la réalisation d'une puce à partir d'un masque (figure 2.1 p. 53). Les structures sont moulées par une couche de résine photosensible sur une surface (les wafers en silicium sont les plus utilisés). Puis une couche de polymère liquide (le plus utilisé est le PolyDiMéthylSiloxane : PDMS) est coulée sur le moule. Après réticulation, le PDMS est démoulé, des canaux y sont imprimés en surface. Ces puces en PDMS sont ensuite fixées sur un

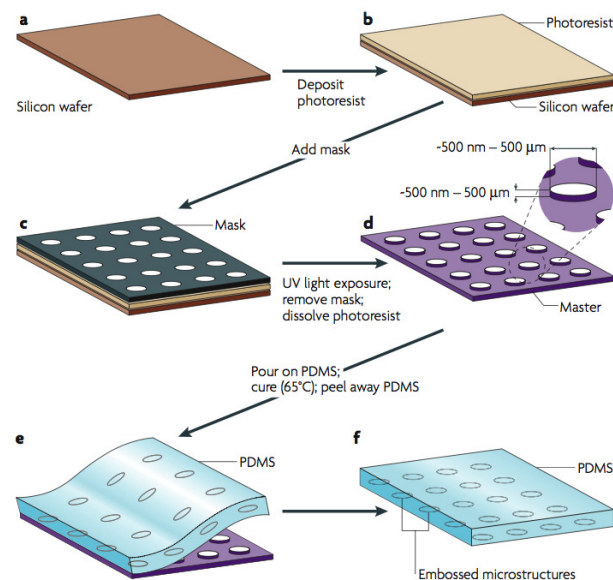


FIGURE 2.1 – Principales étapes de la conception d'une puce microfluidique [109].

substrat solide (le plus couramment employé est le verre) concevant ainsi une puce

qui peut être employée comme outil appliqué aux mesures biologiques.

Limites

Le PDMS est un matériau attractif en ce qui concerne les applications des micro-fabrications en microbiologie. En effet, le silicone est non toxique et perméable aux gaz [74]. Les experts expliquent que malgré ses nombreuses qualités, le PDMS possède, comme n'importe quel matériau, quelques inconvénients liés à son utilisation. Les plus contraignants pour les cultures d'organismes sur puce sont :

- L'absorption de molécules par le PDMS.
- L'évaporation des phases aqueuses à travers le PDMS.

Les molécules biologiques et certains biocides sont le type de molécules victimes de l'absorption [98]. Dans le cadre des études envisagées, ce genre de comportement est un inconvénient majeur au contrôle des conditions extracellulaires. D'autant plus que les micro-canaux offrent un important rapport surface sur volume, ce qui implique qu'il y a une grande source d'absorption.

Même si le PDMS permet la diffusion de gaz à travers lui, le rendant parfait pour la culture cellulaire (pour la diffusion du dioxygène et du dioxyde de carbone principalement), l'évaporation de l'eau s'avère être aussi un inconvénient majeur. En effet, un bon nombre de micro-organismes sont sensibles aux variations de la pression osmotique du milieu environnant, pression qui fluctue lorsque l'eau s'évapore. Ce phénomène incontrôlable est donc un autre frein au contrôle du milieu extracellulaire.

Pour faire un choix parmi les matériaux à disposition, il faut trouver le plus adapté aux conditions expérimentales voulues. Il existe de nombreuses alternatives au PDMS, comme l'utilisation d'autres polymères [74] :

- Les perfluoropolyethers (PFPE).
- Le cycloolefin copolymer (COC).
- Le thermoset polyester (TEP).

2.1. La microbiologie explorée avec des outils miniaturisés

- Le polyméthylmétacrylate (PMMA).

La déformabilité et l'état de surface difficilement contrôlable sont les principales limites des élastomères, c'est pourquoi le second matériau utilisé en micro-fabrication est le verre. Les micro-procédés s'adaptent donc aux nécessités des expérimentateurs. Les matériaux sont évolutifs en fonction des exigences des contraintes expérimentales.

2.1.3 Applications en microbiologie

L'essor et l'engouement, au cours de ces dernières années, qu'ont suscités les micro-technologies, ont permis d'élaborer quelques outils d'analyses biologiques [34, 109]. Elles sont fréquemment employées, et servent déjà à plusieurs spécialités clés en microbiologie [109] :

- L'organisation intracellulaire et réplication des cellules
- Les mécanismes de communication entre cellules
- L'organisation et les caractéristiques de structures multicellulaires
- Les mécanismes de différenciation et les comportements
- L'isolation et la culture de souches microbiennes

Il y a de nombreux exemples d'applications des techniques de lithographie douce en microbiologie [34, 109]. Concernant nos investigations, on relève certains procédés mesurant la croissance bactérienne en présence et en l'absence d'antibiotiques [5, 10, 19, 42]. Tout comme les outils macroscopiques, ces procédés permettent de compartimenter les échantillons de façon indépendante et d'y effectuer des mesures non-invasives (figure 2.2 p.56).

La miniaturisation de réservoirs pour la croissance d'organismes est une alternative à la culture macroscopique en éprouvette, sur surface en gel ou en puits. Ces procédés améliorent le contrôle extracellulaire direct, diminuent la quantité de composants nécessaires pour les expériences et surtout permettent l'expérimentation dans de nombreuses enceintes. Les expériences sont basées sur les méthodes

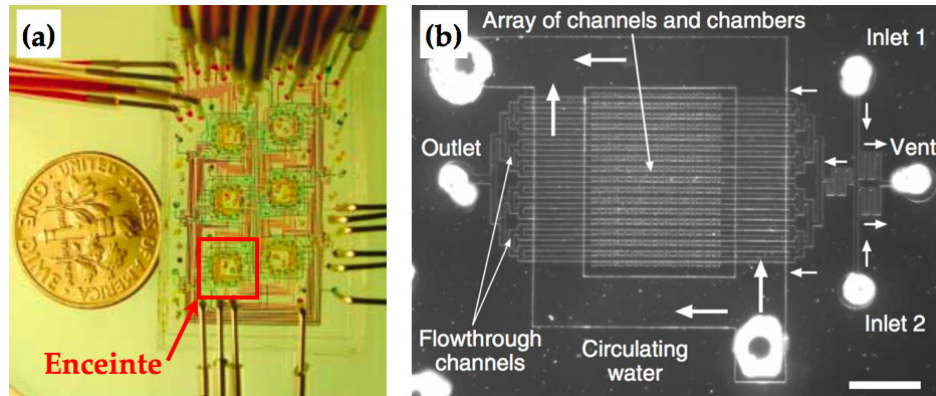


FIGURE 2.2 – Puce contenant des enceintes allouées à la croissance d’organismes - (a) : 6 enceintes [5] - (b) : 340 canaux [42]

macroscopiques couramment employées en améliorant surtout la résolution de mesure. En effet, ces méthodes rendent possible l’observation des organismes à haute résolution (à l’échelle de la cellule unique). Ces dispositifs miniaturisés peuvent accroître le temps de réponse de certains tests, et notamment celui de la CMI.

2.1.4 Détermination de la CMI par des micro-systèmes

La technique de compartimentalisation en micro-canaux, utilisant la lithographie douce, a ouvert la voie à la conception d’enceintes dédiés aux tests de sensibilité d’organismes aux antibiotiques [19].

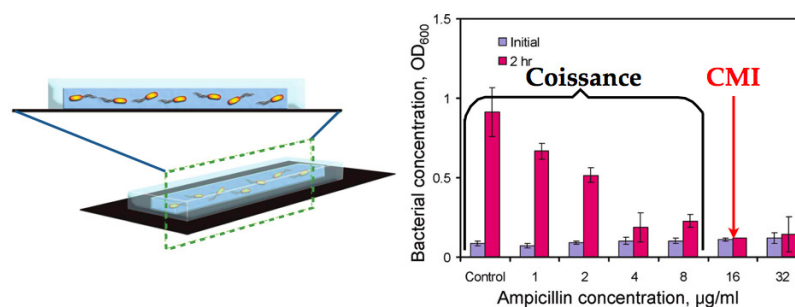


FIGURE 2.3 – Détermination de la CMI en utilisant des micro-canaux [19].

2.1. La microbiologie explorée avec des outils miniaturisés

Les pratiques cliniques courantes requièrent entre un et plusieurs jours pour obtenir la réponse après la collecte d'un échantillon des agents pathogènes. Alors que les tests effectués dans les canaux micro-fluidiques ne nécessitent que quelques heures (moins de dix). Dans les expériences réalisées (figure 2.3 p.56), la réponse de la CMI d'un antibiotique est obtenue deux heures après l'incubation de la puce (ici à $16 \mu\text{g}/\text{mL}$). L'inspection des cellules dans la puce se fait par microscopie optique, la densité est évaluée par une caméra montée sur le microscope, et mesurée par un spectromètre.

Le large rapport surface sur volume qu'offre la micro-fluidique facilite l'oxygénation des bactéries et, dans de nombreux cas, augmente le taux de croissance. C'est la perméabilité du polymère utilisé (PDMS) qui permet une oxygénation plus efficace.

Les dispositifs créés par micro-fabrication révèlent donc leur potentiel par des mesures de premier ordre comme la croissance bactérienne. Ils offrent également la possibilité de procéder à des analyses complémentaires comme la mesure de la CMI.

2.1.5 Les laboratoires sur puce

L'essor des micro-fabrications répond aux nécessités de mesure microbiologiques. Mais pas seulement par la création de nouveaux réservoirs de croissance (figure 2.2 p.56) ou d'autres manipulations (sélection d'objets, analyse, séparation, *etc...*). En réalité, ces circuits sont souvent les modules d'un outils plus complexe. Aux micro-technologies est associé le concept de laboratoire sur puce. Ce dernier définit l'association de diverses manipulations au sein d'un même circuit.

Les différents modules qui effectuent des manipulations indépendantes existent déjà, mais ne sont pas associés en un outils. C'est en cela que réside toute la puissance des micro-fabrications : la possibilité de concevoir des structures intégrées sur puce accomplissant différentes tâches. La schématisation [34] montrée figure

2.4 (p.58) illustre parfaitement le concept de laboratoire sur puce. Cet exemple

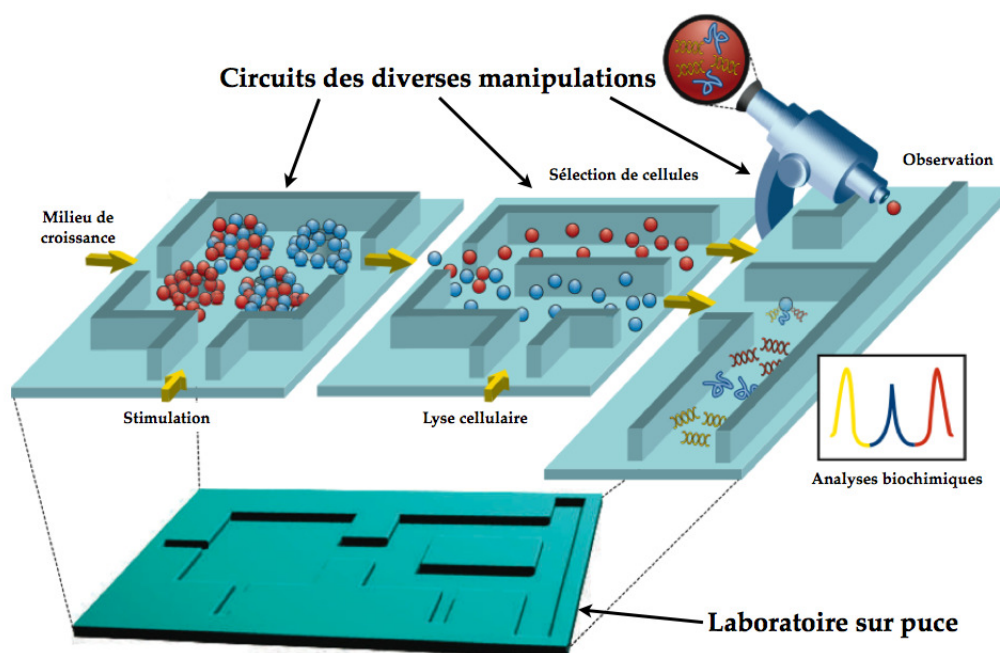


FIGURE 2.4 – Schématisation d'un laboratoire sur puce composés de plusieurs modules, la culture de cellules suivit de la sélection d'organismes. Les rouges sont directement observées, tandis que les bleues subissent la lyse afin d'en extraire des composés qui sont analysés par la suite [34].

illustre la façon dont doit procéder un laboratoire sur puce : en effectuant diverses tâches.

De tels outils émergent (figure 2.5 p.59). En définitive, le domaine de la micro-fabrication est une voie ouverte aux mesure biologiques. En effet de nombreux modules sont capables d'effectuer des tâches biochimiques, comme la culture de cellules et l'analyse. Ces manipulations peuvent être multiplexées en une seule puce dédiée aux expériences biochimiques.

La performance majeure de la micro-fluidique réside dans l'accès à de nombreuses expériences, isolées dans des canaux, par unité de temps. Ce qui définit un nouveau moyen expérimental pour produire diverses gammes de mesures chimiques

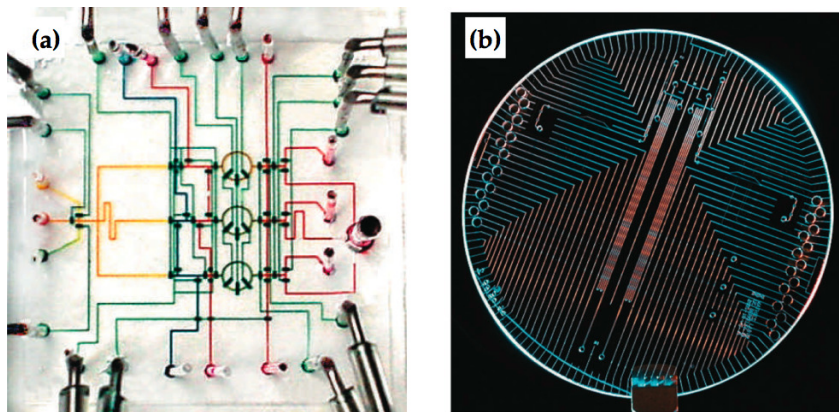


FIGURE 2.5 – (a) : Photographie d'un circuit d'extraction et purification d'ADN [34]. Les colorants produisent la distinction des différents canaux - (b) : Photographie d'un micro-bioprocasseur servant au séquençage d'ADN par la méthode de Sanger [29].

et biologiques [50].

Les systèmes micro-fluidiques se heurtent néanmoins à des limites, telles que la dispersion des molécules au sein du liquide par diffusion ou par dispersion de Taylor-Aris (due au profil de vitesse parabolique) [6, 50]. En conséquence, des micro-compartiments sous la forme de gouttes sont de plus en plus souvent utilisés. En effet, ils permettent d'utiliser les technologies micro-fluidiques tout en s'affranchissant des limites intrinsèques aux écoulements dans les canaux [6].

2.2 Microbiologie en gouttes

Les procédés de micro-fabrication de pointe ouvrent des perspectives d'études attractives. Certains de ces outils sont, par ailleurs, basés sur l'élaboration de structures en puce vouées à la conception de gouttes d'émulsion. La micro-fluidique de goutte (ou micro-fluidique digitale) est une méthode alternative aux enceintes, dont les gouttes sont les compartiments réactionnels et les échantillons des mesures. La conception de gouttes se fait par l'application d'écoulements diphasiques dans des micro-canaux. Les tailles de gouttes sont très bien contrôlées, et leur composition interne l'est tout autant. La micro-fluidique digitale s'inscrit dans les procédures de

conception de laboratoires sur puces. Ces derniers sont déjà appliquées à quelques mesures pharmacodynamiques.

2.2.1 Ecoulements diphasiques dans un micro-système

Les dispersions liquide-liquide et liquide-gaz sont des procédés très utilisés à l'échelle macroscopique. On les retrouve dans les domaines de la chimie, de la cosmétologie et l'industrie agro-alimentaire, donc les exemples d'applications des émulsions sont abondants [91].

Récemment les expériences se sont focalisées sur la génération et la manipulation d'émulsion en utilisant la micro-fluidique. Il existe de multiples méthodes en micro-fabrication permettant de générer et manipuler des gouttes [23]. La micro-fluidique digitale par application de flux est un procédé simple à mettre en oeuvre, et le plus utilisée.

La micro-fluidique digitale est basée sur l'élaboration d'émulsions par le contrôle des flux d'injection des phases dispersée (Q_d) et continue (Q_c) dans un canal. Il existe différentes géométries de formation, par focalisation de flux (flow focusing), par flux co-linéaire (co-flowing), ou encore par croisement de flux (jonction en T). La géométrie de formation que nous emploierons est la jonction en T (figure 2.6 p.61). La formation d'une goutte est régie par le cisaillement qu'applique la phase continue sur la phase dispersée. Ce cisaillement va déformer l'interface entre les deux fluides jusqu'à la génération d'une goutte. Le nombre adimensionnel qui caractérise ce phénomène est le nombre capillaire C_a . Il exprime la compétition entre les forces de cisaillement et les forces interfaciales, ces dernières tentant de retenir la phase dispersée dans son canal :

$$C_a = \frac{U \cdot \mu_c}{\gamma} \quad (2.1)$$

Avec μ_c la viscosité dynamique de la phase continue, et γ la tension interfaciale entre les fluides. U décrit la vitesse caractéristique de la phase continue.

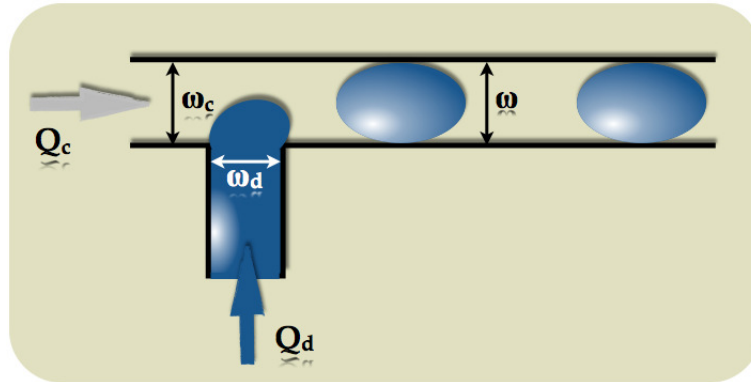


FIGURE 2.6 – Schématisation de la génération de gouttes par confinement en jonction en T. En micro-fluidique la géométrie est rectangulaire et la hauteur des canaux est définie comme étant h .

Le flux de la phase dispersée pénètre dans le canal principal et une goutte commence à croître. Les deux fluides immiscibles forment alors une interface à la jonction des canaux. L'interface se déplace dans le sens du flux de la phase continue et forme un col au niveau de la jonction des canaux. Par le déplacement de l'interface, le col se resserre jusqu'à la rupture ce qui forme une goutte (figure 2.7 p.61).

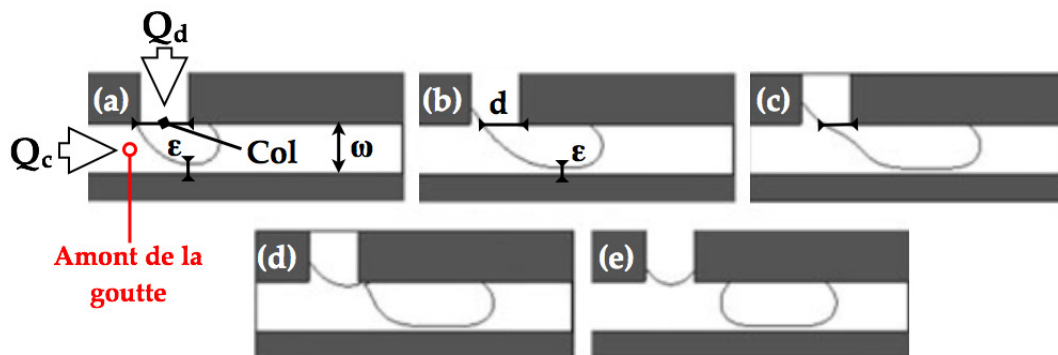


FIGURE 2.7 – Formation d'une goutte en jonction en T [28]. (a) : la phase dispersée entre dans le canal principal et le bouclier. - (b) à (c) : le col se rétrécit. - (d) : le col se rompt. - (e) : une goutte se libère et s'écoule dans le canal principal.

Chapitre 2. Milli-fluidique et microbiologie

La taille d'une goutte est calibrée par de nombreux facteurs. Tout d'abord, au moment où la phase dispersée entre dans le canal principal et le bouche, la longueur, L , de la goutte est environ égale à la largeur, w , du canal (figure 2.7.a p.61), et d est la taille du col à cet instant.

Les gouttes émergentes restreignent le débit de la phase continue dans le film fin de lubrification, entre l'interface des liquides et les parois des micro-canaux, d'épaisseur ϵ . Plus la goutte croît dans le canal, plus la distance ϵ décroît (figure 2.7.a-b p.61). Cet espace, ϵ , de confinement augmente localement la résistance au flux de la phase continue [28, 39]. Et l'augmentation de la résistance produit, en amont de la goutte, l'accroissement de la pression, qui comprime l'interface jusqu'à ce que le col soit trop fin et se brise. La force de pincement du col, F_P , dépend de la distance, ϵ [23].

$$F_P \approx \frac{\mu_c \cdot Q_c \cdot w}{h^2 \cdot \epsilon^2}$$

Rappelons que h est la hauteur des canaux. Lorsque la goutte entre dans le canal, la pression de la phase continue en amont est élevée et varie en $1/\epsilon^2$. Cette pression comprime donc le col au niveau de l'interface, et diminue sa taille à la vitesse, V_c , telle que :

$$V_c \approx \frac{Q_c}{h \cdot w}$$

Pendant ce temps de compression, la phase dispersée progresse dans le canal et la taille de la goutte s'allonge à une vitesse, V_e comparable aux flux de la phase dispersée.

$$V_e \approx \frac{Q_d}{h \cdot w}$$

De ce fait la longueur finale de la goutte est la somme de la longueur initiale de la goutte avant de boucher le canal (w), et de la longueur gagnée pendant son temps d'élongation dans le canal, t_e . Ce dernier étant le temps imparti pour comprimer

2.2. Microbiologie en gouttes

le col de longueur initiale, d , jusqu'à sa rupture :

$$L \approx w + t_e \cdot V_e \Leftrightarrow L \approx w + \frac{d}{V_c} \cdot V_e$$

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

En résumé, c'est donc la largeur du canal et le ratio des débits imposés qui déterminent la longueur finale d'une goutte, et de façon générale [39] :

$$\frac{L}{w} \approx 1 + \alpha \cdot \frac{Q_d}{Q_c} \quad \text{avec} \quad \alpha = \frac{d}{w} \quad (2.2)$$

Cette relation est vérifiée expérimentalement [39] (figure 2.8 p.63). Les diffé-

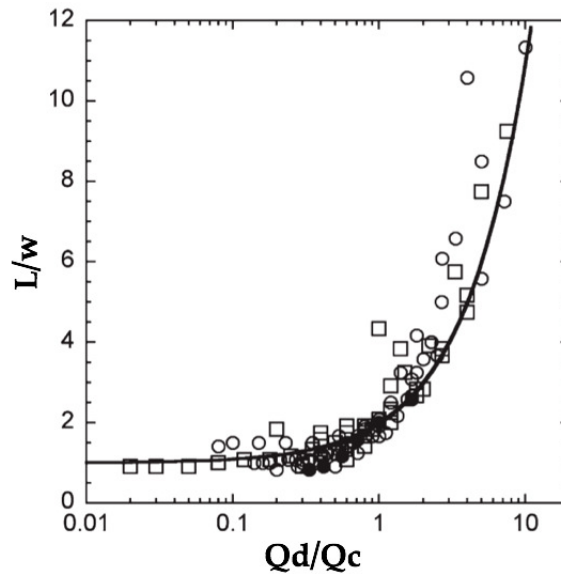


FIGURE 2.8 – Influence du ratio des débits des phases (Q_d/Q_c) sur la génération de gouttes à différentes viscosités de la phase continue [39].

rents points représentent les tailles de gouttes à différentes viscosités de la phase continue, en présence ou non de tensioactifs. La courbe noire continue est la courbe tendance (équation 2.2 p.63). Ces résultats valident donc le modèle et permettent

Chapitre 2. Milli-fluidique et microbiologie

d'observer deux domaines distincts de la variation des tailles de gouttes en fonction du ratio des débits.

- Lorsque $Q_d/Q_c \ll 1$, la variation de la taille des gouttes est très peu sensible aux rapports des débits.
- Lorsque $Q_d/Q_c \gg 1$, la variation de la taille des gouttes est très sensibles aux rapports des débits.

L'existence de ces domaines est lié aux temps de formation d'une goutte t_f . Ce temps est la somme du temps qu'il faut pour remplir la section du canal principal, t_e , avec le temps qu'il faut pour comprimer le col jusqu'à la rupture, t_c [39].

Lorsque le flux de la phase continue est plus important que le flux de la phase dispersée (régime $Q_d/Q_c \ll 1$), on suppose que dès que la goutte a rempli la jonction du canal elle est arrachée très rapidement ($t_c \ll t_e$). Donc $t_f \approx t_e$, et implique que la taille des goutte est relativement constante.

$$\frac{L}{w} \approx 1$$

Dans ce régime la taille des gouttes ne dépend pratiquement pas des valeurs des débits des phases.

Puis, lorsque $t_f \approx t_c$ (régime $Q_d/Q_c \gg 1$) le terme qui fixe la taille de la goutte provient du débit de la phase dispersée pendant la période de resserrement du col. Et donc :

$$\frac{L}{w} \approx \alpha \cdot \frac{Q_d}{Q_c}$$

Dans ce régime, la taille des gouttes dépend fortement des valeurs de chaque débit des phases.

Il est important de noter que la viscosité, le confinement, la forme des canaux et enfin le mouillage local des parois par la phase dispersée jouent un rôle fondamental sur la formation des gouttes [31, 43, 97]. Malgré cela, la micro-fluidique digitale permet de générer des gouttes en cadence de tailles contrôlées et paramétrées par la taille du canal principal [1, 23, 28, 31, 39, 43]. En comparaison avec les

méthodes traditionnelles, les technologies micro-fluidiques permettent l'uniformité des gouttes. Cette monodispersité très souhaitée se joue sur 3% [41].

2.2.2 Contrôle en composition des gouttes

La particularité des gouttes est de pouvoir agir comme des compartiments de réactions chimiques et biologiques [50, 86].

Tout d'abord, la taille des puces microfluidiques permet de contrôler aisément les contraintes externes. Il est effectivement possible d'enfermer ces puces dans des enceintes elles-même contrôlées en pression, température, humidité *etc...* Ce qui fait que les contraintes externes des échantillons sont contrôlées. Par la conception même de gouttes, ces compartiments sont isolés les uns des autres et des parois des canaux [6]. Ceci limite donc la contamination d'un compartiment par des agents extérieurs. Il est également possible lors de la conception d'une goutte de contrôler finement sa concentration en réactifs. La proportion des débits de liquides miscibles amenés à une jonction de formation permet de déterminer la concentration en réactifs dans la goutte [87] (figure 2.9 p.66). Par exemple, si on souhaite composer une goutte de trois réactifs, le ratio entre leur propre débit et le débit total permet de calculer leur concentration au sein de la goutte.

$$C_A = C_A^{source} \cdot \frac{Q_A}{Q_{total}}, \quad C_B = C_B^{source} \cdot \frac{Q_B}{Q_{total}}, \quad C_C = C_C^{source} \cdot \frac{Q_C}{Q_{total}}$$

Cela signifie que la compositions en réactif au sein de la goutte peut être défini initialement, ce qui offre un contrôle sur la composition interne de la goutte.

Par contre dans certains cas les réactifs doivent être mélangés plus tard dans le processus de réaction. La micro-fluidique digitale offre l'opportunité de concevoir des gouttes indépendantes contenant les réactifs (figure 2.10 p.67). D'autres façons de faire sont possibles, le plus important est de pouvoir obtenir deux gouttes successives contenant les réactifs à ne pas mélanger immédiatement. Par la suite il est possible de contrôler leur fusion [12, 94], cela permet de déclencher la réaction

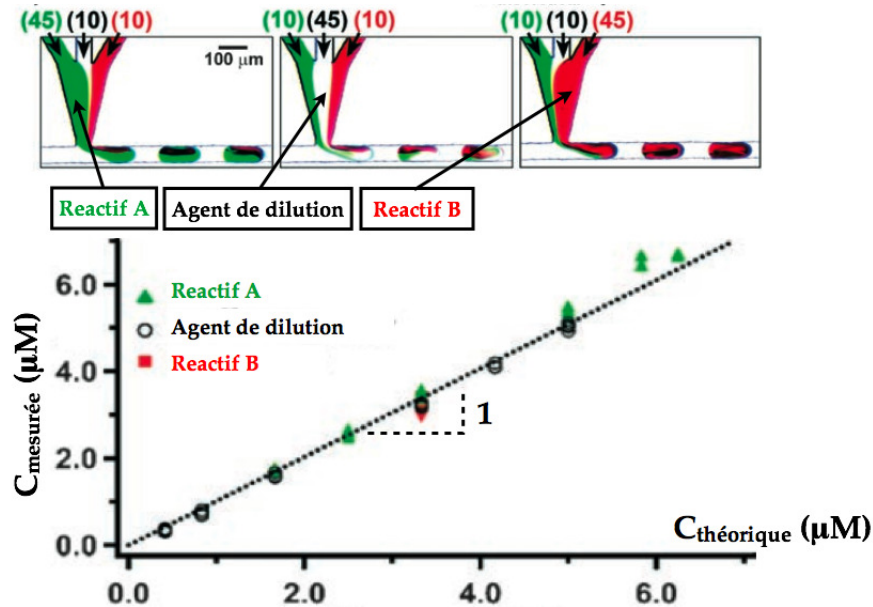


FIGURE 2.9 – Photographies de trois dilutions effectuées à la géométrie de formation. Et courbe de comparaison entre la concentration théorique calculée à partir des débits imposés et la concentration des réactifs mesurée dans des gouttes [87].

souhaitée au moment voulu. Le mélange des gouttes se fait sur une dynamique très rapide [41, 51, 88] et permet de soutenir que les gouttes sont contrôlables et contrôlées en composition ; qu'il soit nécessaire d'effectuer un mélange de réactifs à la formation de la goutte ou de faire fusionner les réactifs à posteriori dans le circuit micro-fluidique.

Ce qui permet également de définir les gouttes comme réacteurs, c'est la faculté d'analyser leur contenu [3, 49, 85, 87]. Il ya deux méthodes pour y procéder : on peut analyser chaque goutte individuellement ou mesurer plusieurs gouttes en même temps. Des exemples montrent que l'analyse peut être accomplie par diverses instrumentation (mesure de l'absorbance, rayons-X, *etc...*) [3, 87]. La fluorescence est un moyen fréquemment utilisé, le contenu de la goutte est détectée par l'expression d'un substrat fluorescent [87].

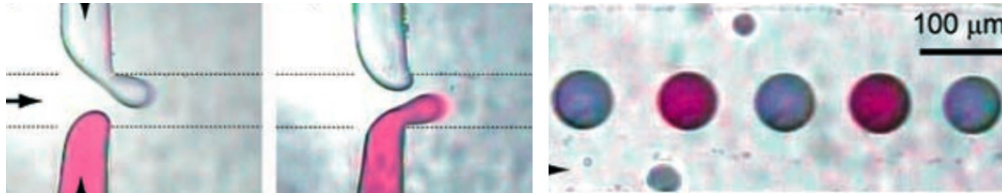


FIGURE 2.10 – Photographies d’un procédé de formation de gouttes alternatives [87].

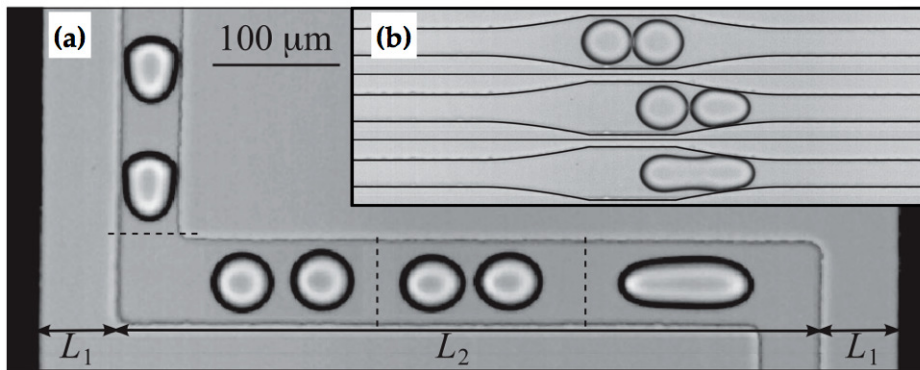


FIGURE 2.11 – Photographies de la coalescence entre gouttes par : (a) application d’un champ électrique par deux électrodes distantes de $2 \cdot L_1 + L_2$ [94] - (b) forçage hydrodynamique [12].

2.2.3 Encapsulation d’organismes

L’utilisation de gouttes comme réservoirs est très utile pour contrôler des réactions, étant donné que l’interface des gouttes agit comme une membrane confinant les contenus [3] (figure 2.12 p.68). Les gouttes sont communément utilisées comme bio-réacteurs, elles procèdent à l’encapsulation d’ADN, d’ARN, de protéines, d’enzymes ou de micro-organismes [6]. Il est donc possible d’encapsuler des micro-organisme pour en analyser le comportement [14, 25, 51, 58, 82, 84].

La compartimentalisation d’expériences individuelles dans des gouttes d’émulsion générées par un dispositif micro-fluidique ouvre de nombreuses possibilités [51, 56]. Notamment la culture de cellules par confinement en gouttes offre l’opportunité de procéder simplement à un échantillonnage à grande échelle (figure 2.13 p.68).

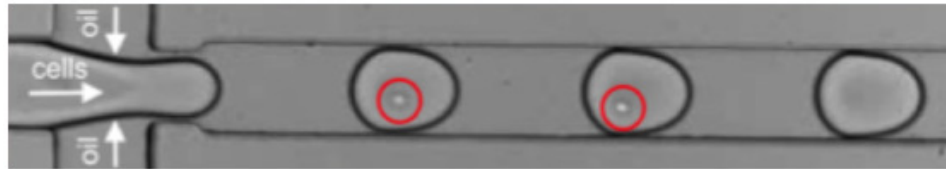


FIGURE 2.12 – Photographie d’encapsulation d’organismes [25].

Les techniques de lithographie permettent de dessiner des structures piégeant les

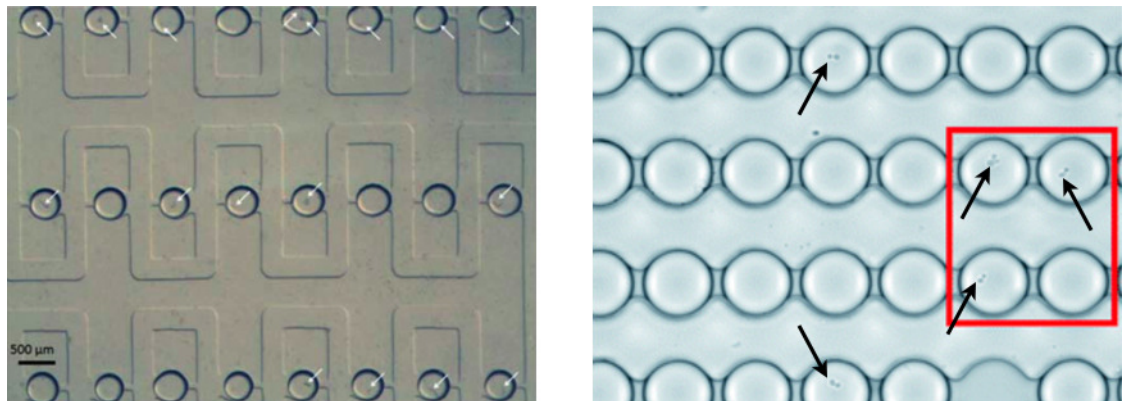


FIGURE 2.13 – Photographies de deux pièges à gouttes différents. Ces dernières encapsulant des cellules repérées par les flèches [82, 84].

gouttes. Par ces moyens, il est possible de produire aisément un millier de réservoirs dont il est possible de suivre la cinétique interne. Les cellules cultivées dans ces dispositifs montre des comportements similaires à celles cultivées en volumes macroscopiques [51].

2.2.4 Distribution d’organismes en goutte

La figure 2.13 (p.68) révèle un inconvénient inhérent à l’encapsulation de faibles inoculum : la majorité des gouttes sont vides. Cela vient du fait que pour parvenir à constituer des gouttes échantillonnant à l’échelle de la cellule unique, la source biologique doit être largement diluée. Le fait de tenter d’encapsuler une bactérie

2.2. Microbiologie en gouttes

dans une goutte force à fortement diluer les bactéries dans la source. Ainsi, l'encapsulation de cellule unique est un événement rare se modélisant par la distribution de Poisson [56, 58, 85].

Si la formation de goutte peut enfermer des cellules, elle ne peut garantir une distribution contrôlée du nombre de cellules. Le nombre de cellules, k , encapsulées en goutte est dicté par la probabilité, f suivant la distribution de Poisson :

$$f(\lambda, k) = \frac{\lambda^k \cdot e^{-\lambda}}{k!} \quad (2.3)$$

Où λ est la concentration moyenne que l'on souhaite en goutte. La figure 2.14

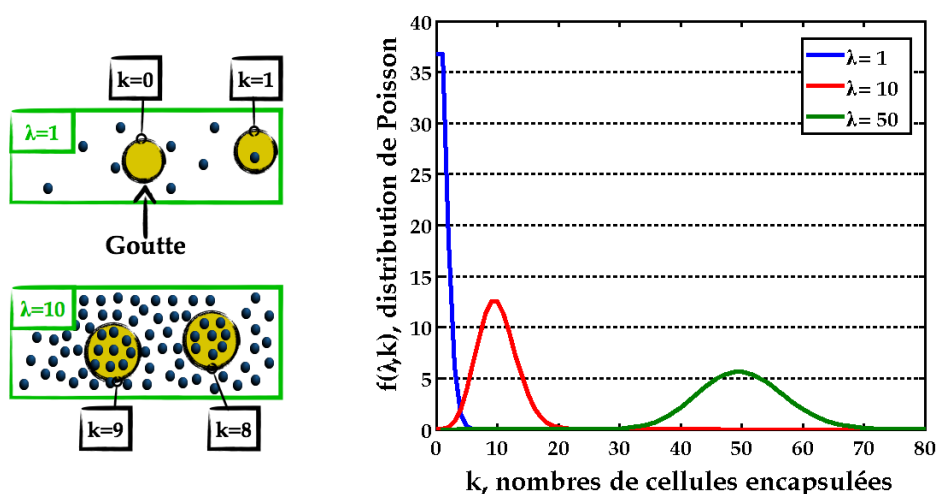


FIGURE 2.14 – Schématisation et représentation de la distribution de Poisson dans des gouttes en fonction de la densité de cellules théoriquement encapsulée (λ).

(p.69) schématise la loi de Poisson. Une source est à une concentration choisie en organismes. Cette concentration correspond à λ que l'on souhaite en goutte, connaissant le volume des gouttes formées. La part de goutte contenant potentiellement k cellules est fonction de λ . Le graphique montre qu'à faible densité cellulaire voulue la probabilité d'avoir des gouttes vides est importante. Si l'objectif est d'effectuer des études sur des cellules uniques, il faut travailler à λ petit, mais la contrepartie est d'avoir beaucoup de gouttes vides. Ils existe quelques

Chapitre 2. Milli-fluidique et microbiologie

techniques permettant de recueillir un grand nombre de gouttes encapsulant des cellules uniques [2, 16, 32]. Par contre, si les études se portent sur de plus fortes densités des cellules biologiques alors il faut d'augmenter λ , ce qui fait qu'on diminue la proportion de gouttes vides jusqu'à ne plus en avoir. Lorsque λ est petit l'encapsulation suit la loi de Poisson, et si λ augmente la part de cellules distribuées dans les gouttes suivent la loi normale [18].

L'écart-type du nombre de cellules que l'on veut encapsuler est : $\sqrt{\lambda}$. Ce qui permet de définir la marge d'erreur d'encapsulation de λ organismes en goutte :

$$\frac{\sqrt{\lambda}}{\lambda} = \lambda^{-1/2}$$

La représentation de la marge d'erreur en fonction de la concentration moyenne en goutte montre que plus le nombre de bactéries à encapsuler est faible plus la marge d'erreur est importante (figure 2.15 p.70)

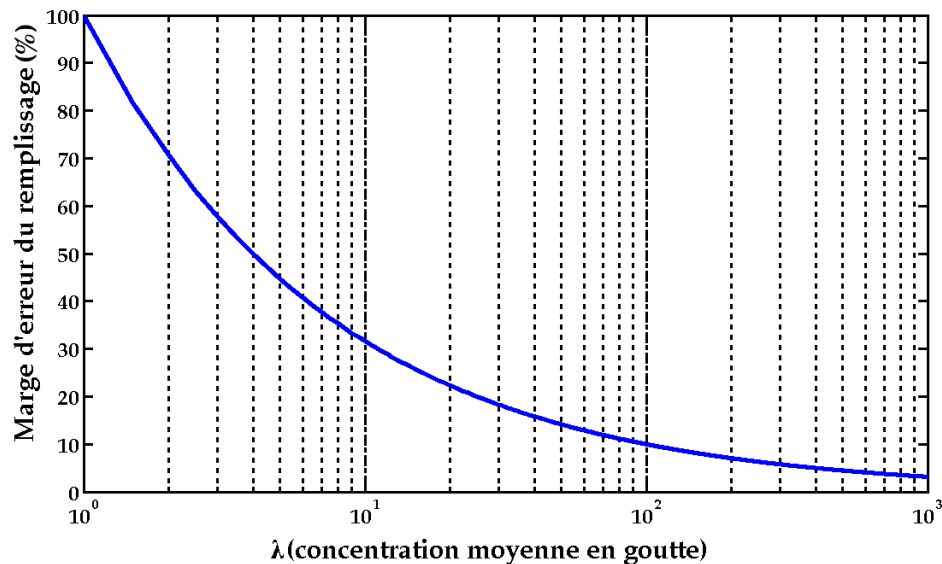


FIGURE 2.15 – Représentation de la marge d'erreur sur l'encapsulation en fonction de la moyenne d'organismes encapsulés en goutte.

La composition interne de ces micro-compartiments est aisément contrôlable,

ce qui permet d'élaborer un environnement extra-cellulaire adapté aux organismes et choisi par l'expérimentateur. Ces procédés permettent de réaliser des analyses rapides sur une large gamme d'échantillons. Ils offrent également la possibilité de tester les micro-organismes sous environnements contrôlés. Finalement, le processus entier est miniaturisé. Ces capacités ont favorisé le développement de nombreuses applications qui n'ont pu être réalisées par d'autres méthodes ; comme la cristallisation des protéines, la cytométrie par flux de pointe et les études de la cinétiques des enzymes [23].

2.2.5 Bioréacteurs sur puce

Les perspectives qu'offre la micro-fluidique digitale ne résident pas uniquement dans les unités fonctionnelles, que sont les modules de conception de fusion ou d'analyse de gouttes. L'assemblage de ces modules offre un fort potentiel d'applications. La modularité est une fonctionnalité attractive de la plate-forme micro-fluidique de gouttes [56]. L'assemblage donne la possibilité d'envisager une unité de mesure complète tels que sont les laboratoires sur puce (section 2.1.5 p.57). Ce type de dispositifs modulables sont conçus pour incorporer les étapes nécessaires pour des analyses de cellules biologiques sur un grand nombre d'échantillons, tout en éliminant manipulations humaines nécessaires, laborieuses et potentiellement sujettes à erreurs [51].

Les robots de manipulation des liquides à haut-débit sont des éléments familiers de laboratoires dans les universités et l'industrie. Mais les investissements financiers nécessaires pour établir et maintenir de telles installations sont importants, limitant ainsi le cercle des utilisateurs. La micro-fluidique digitale apporte une alternative expérimentale à moindre coût, où les gouttes sont les compartiments de réaction, l'équivalent en miniature de tubes à essais. Les modules individuels correspondent à une étape expérimentale [56].

La génération de gouttes, le transport, la fusion, la scission pour prélever des échantillons de gouttes, l'incubation, l'analyse et le tri sont maintenant des pro-

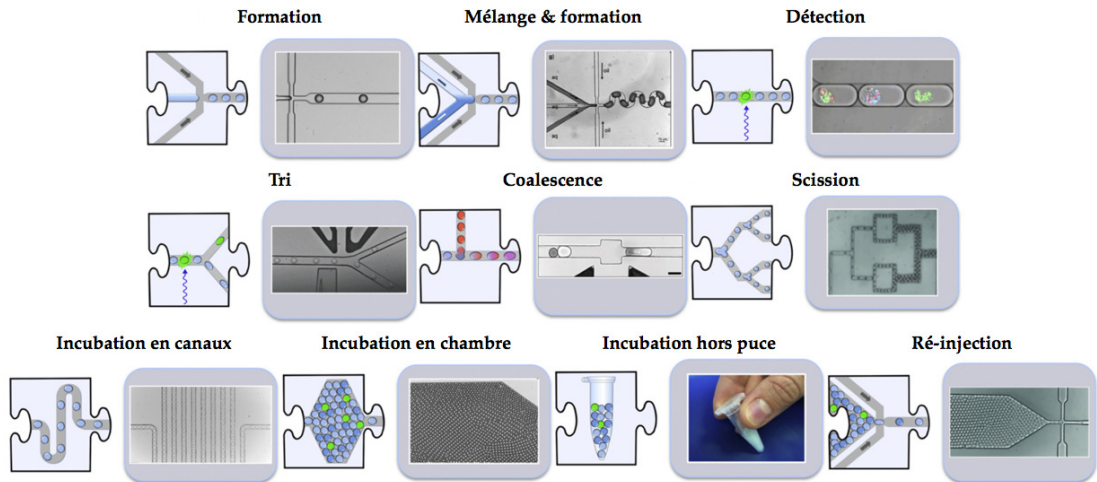


FIGURE 2.16 – Schéma de puzzles assemblables des modules micro-fluidiques servant aux étapes expérimentales [56].

cessus bien établis [6, 41, 56]. Cependant, malgré la simplicité conceptuelle d'un assemblage modulaire en puzzles, un niveau relativement élevé d'expertise est actuellement nécessaire pour assembler ces modules dans des dispositifs fonctionnels [56]. En mettant de côté les défis de l'intégration des modules entre eux, l'intégration de systèmes micro-fluidiques permettra la réalisation de séquences complexes d'opérations élémentaires sur des gouttes. De tels outils peuvent offrir une solution pour la miniaturisation et l'automatisation de tests biologiques ainsi qu'une augmentation de la cadence et la précision d'analyses et de sélections [6, 50, 51].

2.2.6 Applications en pharmacologie

Quelques outils pionniers dans le domaine de la micro-fluidique modulaire sont appliqués aux études d'effets de biocides sur des cellules.

Tout d'abord, une composition de huit concentrations différentes de mitomycine C, a été examinée dans des gouttelettes pour son effet sur des cellules de mammifères (U937) [14]. Dans cette expérience, les cellules sont encapsulées avec la mitomycine C. Ensuite, les gouttes sont fusionnées avec des gouttes contenant un

2.2. Microbiologie en gouttes

colorant déterminant la viabilité des cellules (par coloration des cellules mortes). Les cellules et la mitomycine C sont ensuite incubées hors puce. Les gouttelettes utilisées sont identifiées en concentration en antibiotique par l'addition de différentes concentrations d'un marqueur fluorescent. Cette expérience est un exemple parfait de validation de principe pour les premiers systèmes intégrés.

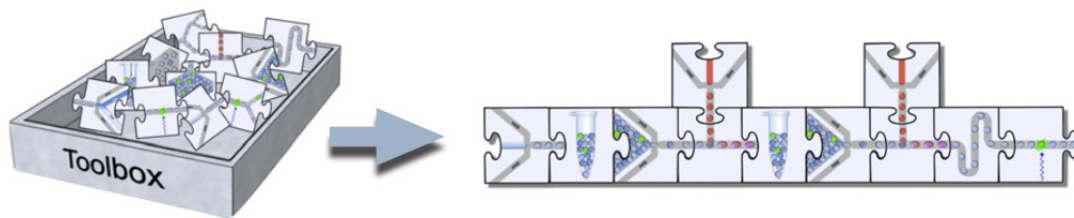


FIGURE 2.17 – Schémas de l'expérience [14] de l'action de la mitomycine C sur des cellules [56].

Les tâches à effectuer sont dessinées sur puce :

1. former des gouttes avec des concentrations différentes en antibiotique
2. les recueillir et les ré-injectées dans le circuit
3. les faire fusionner avec des gouttes encapsulant des cellules uniques
4. incuber les gouttes résultantes hors puce
5. ré-injecter à nouveau et faire fusionner avec des gouttes contenant un marqueur de viabilité
6. incuber les gouttes sur puce
7. analyser les gouttes par fluorescence pour connaître les concentrations délétères

C'est autant de manipulations fastidieuses et soumises aux possibles erreurs, lorsqu'elles sont effectuées par un expérimentateur, qu'un système robotisé peut tout aussi bien produire. De plus, les données obtenues dans les gouttes sont cohérentes avec des expériences analogues en micro-plaques validant ainsi le concept [56].

Chapitre 2. Milli-fluidique et microbiologie

Un second exemple d'étude, très proche de ce que nous voulons effectuer, a vu l'intérêt se porter sur la détermination de la CMI d'un antibiotique sur des organismes [10].

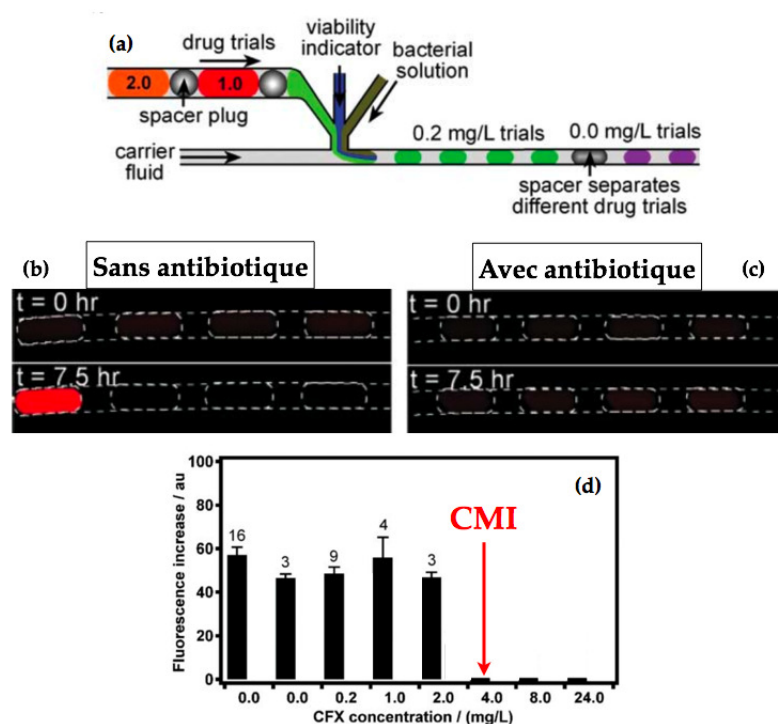


FIGURE 2.18 – [10] - (a) : Schéma de la formation des gouttes. (b) : Photographie montrant la fluorescence en l'absence d'antibiotique. (c) : Photographie en présence d'une concentration en antibiotique. (d) : Accumulation des mesures et détermination d'une CMI.

Ces "micro-échantillons" déterminent la viabilité des bactéries par un marqueur fluorescent (alamarBlue) (figure 2.18(a) p.74) [10].

Les gouttes sont acheminées vers un capillaire, qui est incubé à température contrôlée. La mesure de la fluorescence exprime la présence bactérienne, par exemple le témoin sans antibiotique (figure 2.18(b) p.74) révèle une goutte fluorescente dans le capillaire, et en présence d'une concentration en antibiotique (figure 2.18(c) p.74) aucune. Les résultats sont reportés dans la figure 2.18(d) (p.74) et

révèlent la CMI d'un antibiotique sur l'organisme étudié (ici 2 mg/L). Par contre la résolution n'est pas améliorée par rapport aux méthodes traditionnelles de détermination de la CMI. En effet, tout comme les mesures conventionnelles, les dilutions en antibiotiques sont préalablement effectuées à la main.

Synthèse

La miniaturisation et l'automatisation de processus standards est un but technologique des sciences biologiques. Parce que, d'une part, la diminution d'échelle permettra le rassemblement d'informations d'un grand nombre d'échantillons avec une réduction simultanée du volume nécessaire aux tests, et d'autre part, l'automatisation réduira la pénibilité et les erreurs possibles des manipulations.

L'exploitation des micro-gouttes, produites par des dispositifs micro-fluidiques, a récemment émergé comme une plate-forme technologique nouvelle et stimulante pour des applications dans les domaines de la chimie et de la biologie. L'intérêt porté aux systèmes micro-fluidiques a été stimulé par une série de caractéristiques fondamentales qui accompagnent la miniaturisation. Ces caractéristiques incluent la capacité de produire et de manier des petits volumes de fluides. Ainsi que, l'avantage d'avoir un faible coût de fabrication et de l'intégration de composants fonctionnels permettant la modularité des puces.

Les études décrites dans les articles [41, 50] indiquent clairement que l'utilisation de micro-gouttelettes, comme outils d'analyse en biologie et en chimie, est un secteur qui offre d'énormes perspectives. La capacité de générer de façon reproductible, de traiter et d'analyser des gouttes isolées de composition variable et à haute fréquence définit un bond colossal en matière de technologie pour l'expérimentation biologique à grande échelle.

2.3 La milli-fluidique

Les travaux sur lesquels nous voulons nous focaliser nous imposent à ne pas utiliser la micro-fluidique digitale. En effet, l'influence de l'inoculum sur la CMI d'un antibiotique nous contraint à encapsuler de nombreux organismes (jusqu'au millier) dans une seule goutte. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur l'emploi de la milli-fluidique lors de nos expériences.

La milli-fluidique est peu développée à l'heure actuelle, la plupart des travaux techniques se sont résignés au développement de technologies permettant de réduire au maximum l'échelle des tailles des circuits, on parle de plus en plus de nano-fabrications. La milli-fluidique est une échelle au dessus de la micro-fluidique. Les canaux utilisés vont de la centaines de microns à quelques millimètres. Ce qui fait que les lois d'écoulement sont similaires [37].

L'augmentation des tailles de circuits s'avère complexe par les procédés de micro-fabrication par photolithographie douce. Mais il est possible d'usiner des matériaux en vue de concevoir des canaux de dimensions supérieures, mais il faut posséder un outillage adéquat. Sinon, il est possible de se procurer des matériaux pré-usinés commercialisés pour la chromatographie liquide. La milli-fluidique est basée sur l'utilisation et la connexion de ce type matériaux (figure 2.19 p.77).

Les outils de chromatographie sont suffisant pour concevoir des modules de base, comme par exemple la conception de gouttes (figure 2.20 p.78).

La figure 2.19 (p.77) présentes les matériaux que nous utilisons, il existe de nombreuses autres matières possibles : le verre, le métal et une grande variété de polymères. Le PEEK (PolyEther Ether Ketone) est un polymère robuste utilisé pour le flux des phases continues dans nos procédés. La transparence du Téflon, plus précisément du FEP (Fluorinated Ethylene Propylene) est nécessaire pour les phases dispersées et leur observation ainsi que leurs analyses. Les jonctions en T sont en Téflon également, en PTFE (PolyTétraFluoroEthylène), car leur hydrophobicité les rendent parfait pour la conception d'émulsions inverses.

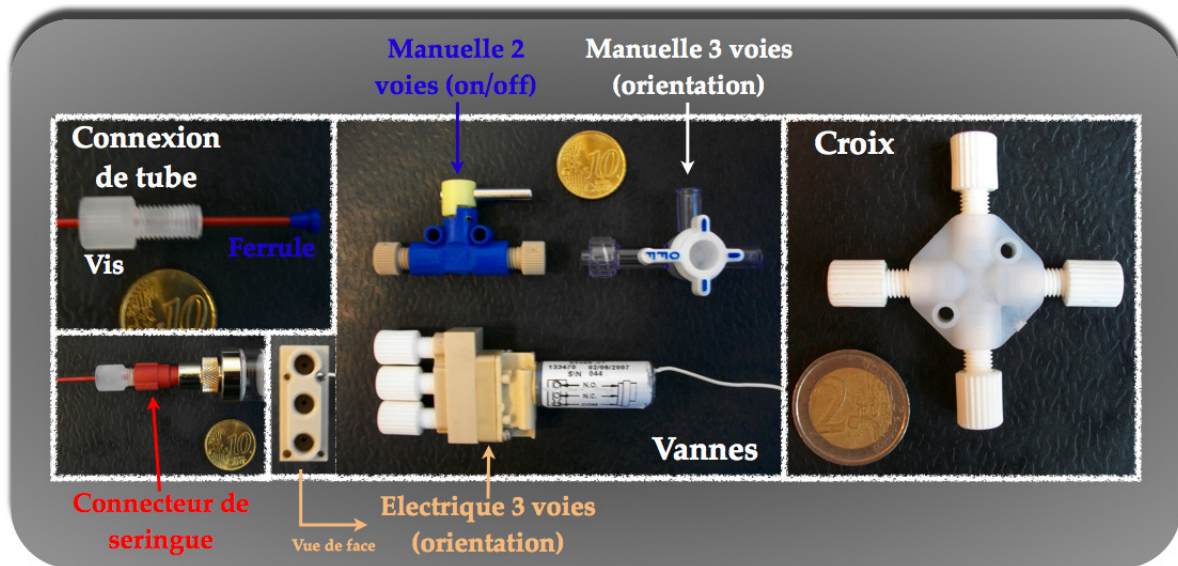


FIGURE 2.19 – Photographies du matériel chromatographique utilisé pour la conception de circuits et la manipulation des fluides.

La milli-fluidique offre de nombreux avantages [37] :

- Le design des circuits permet un gain considérable en temps. Il n'est pas nécessaire de concevoir de masque. La tâche se résume à assembler et connecter.
- Le coût de conception des réseaux milli-fluidique est faible.
- Le réseau milli-fluidique est dissociable. Il est possible de connecter et déconnecter différentes pièces (figure 2.19 p.77) en vue de modifier le circuit. Dans le cas de la micro-fluidique, toute tentative de modification d'un circuit nécessite la conception de nouveaux masques.

Ainsi la milli-fluidique offre la possibilité de manipuler de plus gros volumes par des micro-procédés. Comme introduit dans cette section, ce procédé offre la possibilité de concevoir des chambres de réactions encapsulées [35, 36], les méthodes de conception de gouttes ne diffèrent pas de la micro-fluidique, les échelles de tailles, sont les seuls paramètres changeant (figure 2.21 p.78).

Le plus important est que la milli-fluidique digitale à l'opportunité de servir comme technologie modulaire. En effet de la même manière qu'en micro-fluidique,

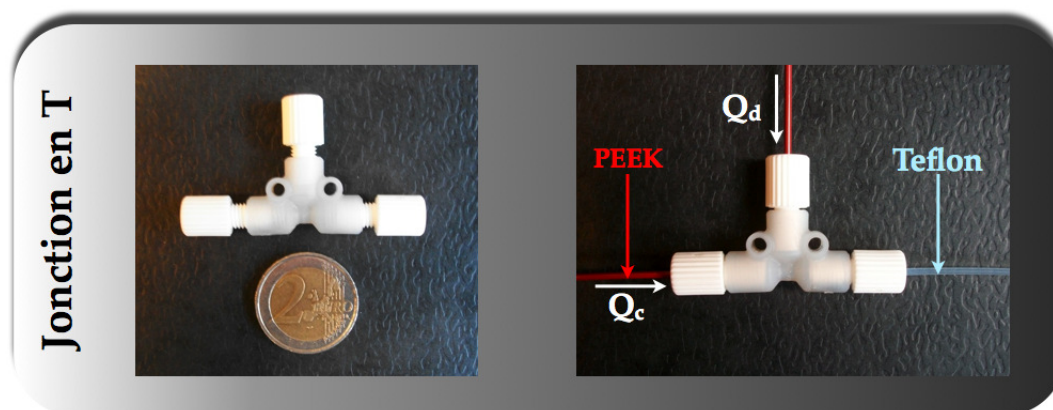


FIGURE 2.20 – Photographies du matériel chromatographique : jonction en T et tubes capillaires.

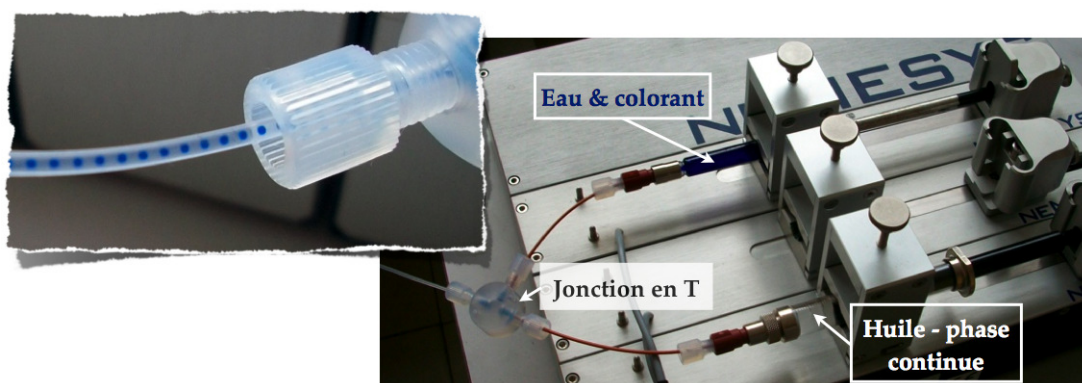


FIGURE 2.21 – Photographie d'un montage de formation de gouttes.

il est possible de former, mélanger, détecter, fractionner, trier, incuber, fusionner des gouttes. Ces caractéristiques permettent d'inscrire la milli-fluidique digitale dans la famille des micro-bioréacteurs sur puce.

Conclusion

Les micro-procédés sont, à ce jour, des technologies couramment employées aux études microbiologiques. Les micro-puces sont particulièrement bien adaptées à l'échantillonnage des micro-organismes. La micro-fluidique digitale en particulier permet d'utiliser des gouttes comme bio-réacteurs. Il est possible de contrôler finement en composition les gouttes ainsi que d'encapsuler nombre moyen déterminé de cellules.

Finalement, les puces micro-fluidiques sont modulables. Il est possible de manipuler des gouttes sur puce comme on peut manipuler des échantillons volume macroscopique. Et il est possible d'associer chaque module de manipulation de goutte pour créer un outil adaptés aux études biologiques.

L'émergence de la milli-fluidique offre une alternative technologique aux méthodes usuelles. La micro-fluidique d'enceintes et de gouttes ayant produits des résultats sur l'étude de la CMI d'un antibiotique ; c'est la voie qui est envisagée pour la détermination et l'étude de l'influence de la densité initiale de cellules sur la CMI d'un antibiotique.

Chapitre 2. Milli-fluidique et microbiologie

Dispositif expérimental

Chapitre 3

Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

Le but fixé est l'analyse de l'effet de l'inoculum sur la concentration en antibiotique minimale nécessaire à l'inhibition de la croissance microbienne (CMI). Nous allons donc examiner l'effet de la concentration en antibiotique sur la croissance bactérienne.

Les outils communément utilisés quantifient la CMI avec une faible résolution. En conséquence, il est nécessaire de développer un outil de détermination de la CMI en améliorant certains paramètres techniques :

- Un échantillonnage plus simple des micro-organismes. Préparation moins longue et moins fastidieuse.
- La simplification de la procédure de conception d'un gradient de concentration en antibiotique
- Une résolution fine entre deux concentrations successives en antibiotique
- L'intervention le moins possible de l'expérimentateur

La micro-fluidique digitale a ouvert la voie vers des méthodes alternatives efficaces et simples, vouées à l'étude d'un large panel d'échantillons. Les volumes de gouttes manipulés pour l'étude des phénomènes de groupes (inoculum large) rend la milli-fluidique plus adaptés comme outils à nos études. Les rectifications et

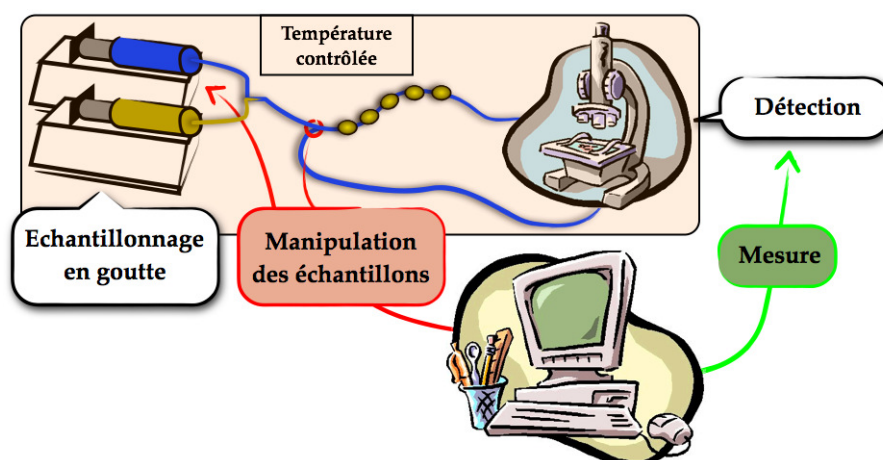


FIGURE 3.1 – Schématisation du dispositif expérimental global.

améliorations techniques à apporter établissent le principe de la technologie développée : la co-encapsulation de bactéries avec un antibiotique, et la mesure de la croissance des organismes. L'outil est élaboré dans le but de concevoir des échantillons de cultures biologiques, indépendants les uns des autres, contrôlés finement en composition. Ces échantillons sont également identifiés et leur suivi individuel au cours du temps, ainsi que la sélection de quelques échantillons, sont possible. La manipulation (par pousse-seringues et électrovannes) et la mesure (par un PMT) des échantillons étant pilotés par ordinateur (figure 3.1 p.84).

3.1 Matériel biologique

L'antibiotique utilisé au cours des expériences est le céfotaxime (figure 3.2 p.85). Le céfotaxime est un antibiotique bactéricide de synthèse de la classe des

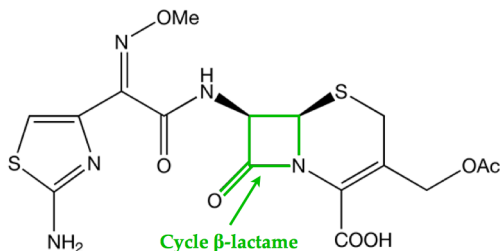


FIGURE 3.2 – Formule chimique du céfotaxime.

céphalosporines, appartenant à la famille des β -lactamines. Les céphalosporines inhibent l'élaboration de la paroi bactérienne par le cycle β -lactame, engendrant ainsi l'accumulation de composés au sein de la cellule ce qui conduit à la lyse des organismes visés.

En micro-biologie l'évaluation de la croissance microbienne se fait communément par mesure de la densité optique au cours du temps. En effet, pendant la croissance, le milieu devient de plus en plus trouble lorsque les bactéries s'y développent. La mesure par absorbance s'est avérée ne pas être assez sensible à la lecture de l'accroissement de la population bactérienne en milli-fluidique tubulaire.

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

Ceci est dû à la trop faible longueur du chemin optique de l'échantillon : égale au diamètre des tubes dans lesquels nous formons les gouttes (0,5 mm). De plus, cette méthode de mesure ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.

Les techniques de manipulations génétiques permettent de modifier le génome des bactéries. Ces procédés rendent les bactéries capables de synthétiser des protéines fluorescentes [27]. Les bactéries étudiées dans la totalité des travaux de cette thèse sont des *Escherichia coli* (***E. coli***) fluorescentes par une synthèse de protéines dont le pic d'excitation est à 514nm et le pic d'émission à 527nm. Ce sont des souches YFP modifiées génétiquement, c'est à dire que la synthèse de fluorophores est dans leur génome. La lecture par fluorescence n'intègre que le signal des cellules viables, car les fluorophores ne sont pas synthétisée par les cellules mortes.

E. coli est considéré depuis près de 70 ans comme un micro-organisme modèle [27]. Cet organisme est facile à cultiver, il est hétérotrophe et prototrophe, ce qui veut dire qu'il a un besoin absolu d'une source de carbone organique comme source énergétique et de biomasse, mais qu'il n'a besoin d'aucun autre métabolite organique (acides aminés, vitamines, etc...). De plus la culture peut être effectuée sans apport de dioxygène car c'est un organisme anaérobie facultatif. L'absence d'oxygène diminue seulement le taux de division de la bactérie.

Dans notre cas, la source nutritive utilisé est le *Lysogeny Broth* (**LB**). Il est, à ce jour, l'un des milieux les plus utilisés pour le maintien en vie et la culture de lignées d'*E. coli*. Ce milieu de culture est un milieu riche en nutriments pour la croissance bactérienne dilués dans de l'eau stérilisée.

Les bactéries sont nourries dans le *LB*, l'antibiotique serra dilué dans ce milieu de croissance. Le tout constitue la phase aqueuse de notre système.

3.2 Physico-chimie des réacteurs et encapsulation

Comme décrit dans le chapitre précédent (section 2.2.3 p.67), les gouttes sont des chambres de réactions très pratiques et aisément concevables. Comme en microfluidique, la taille des gouttes est contrôlée principalement par les débits des phases imposés. Lorsque la jonction en T est choisie, seuls les débits imposés influencent la taille des gouttes (figure 3.3 p.87).

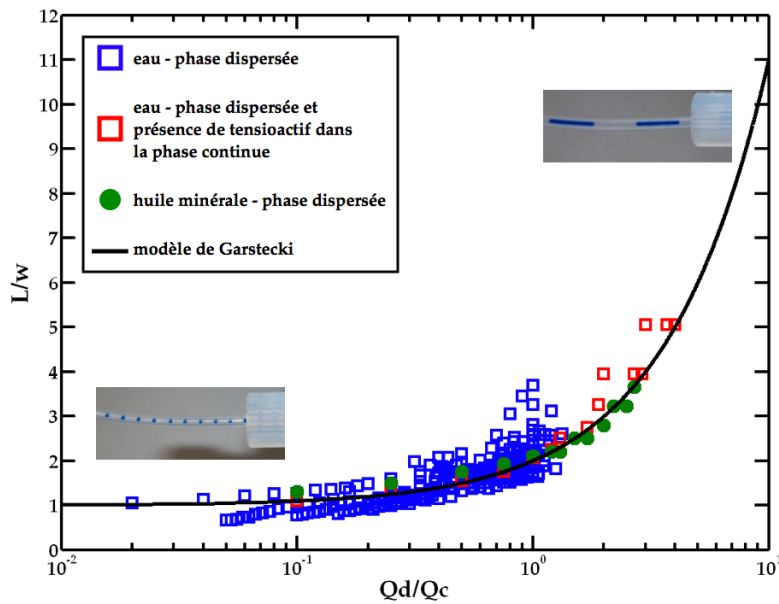


FIGURE 3.3 – Représentation de la dépendance de la taille relative des gouttes aux débits imposés selon le modèle [39] en tracé noir continu. Pour $w = 0,5 \text{ mm}$ et différents cas d'émulsion : de l'eau en phase dispersée, avec ou sans tensioactifs dans la phase continue et l'utilisation de l'huile minérale comme phase dispersée.

L'émulsion est formée avec deux fluides non miscibles. Les fluides sont transportés à débits constants à travers des capillaires en PEEK jusqu'à la géométrie de formation de gouttes (figure 2.21 p.78). Les débits sont contrôlés par des pousse-seringues.

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

C'est la mouillabilité de la surface par les fluides qui détermine quel fluide est la phase dispersée et lequel est la phase continue. La phase dispersée est le milieu de culture des organismes. La phase continue est l'huile fluorée HFE-7500 (3MTMNovecTM), grâce à sa grande mouillabilité envers les matériaux en Téflon de formation et de transport de gouttes. Les jonctions en T et les tubes transportant les gouttes sont respectivement du PTFE et du FEP. Afin de prévenir des problèmes de stabilité d'émulsion, de fuites de certains composants et la compatibilité biologique, nous utilisons un tensioactif : le PFPE-PEG [48] développé par RaindanceTM Technologies à 0,005% en masse (CMC à 0,1%).

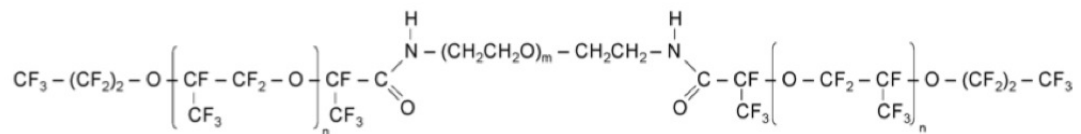


FIGURE 3.4 – Structure chimique du bock-copolymère PFPE-PEG. Une tête poly(ethylene)glycol (PEG) et deux queues poly(perfluoropropylene)glycol (PFPE) [48].

L'encapsulation d'un nombre déterminé d'organismes en goutte est une simple procédure de dilutions successives. Toutes les dilutions sont effectuées dans la solution nutritive (*LB*). Les bactéries sont initialement incubées en volume (tubes à essais) à 37°C jusqu'à ce qu'elles soient en phase exponentielle. Pour cela il faut attendre plusieurs heures (entre six et huit) et mesurer la densité optique au spectromètre, afin d'approcher une densité optique valant environ 0,5. A ce niveau, la concentration de cellules dans le milieu est suffisamment importante, et les bactéries ne sont pas en phase stationnaire. La concentration du bouillon, C_o , est déduite de sa corrélation avec la densité optique de l'échantillon mesuré à 600 nm (DO_{600}) dans une cuvette de chemin optique de 1 cm :

$$C_o = 3,7 \cdot 10^8 \cdot DO_{600} \quad (3.1)$$

3.2. Physico-chimie des réacteurs et encapsulation

On détermine donc la concentration en bactéries du bouillon. On connaît le volume des gouttes, V_g (typiquement 100 nL dans nos expériences), dans lesquelles on veut enfermer un inoculum, n_i . Il faut calculer la concentration en *E. coli* que l'on doit encapsuler $C_i = V_g \cdot n_i$, pour savoir de combien diluer le bouillon. La dilution à la concentration C_i en bactéries dans le milieu de culture est la solution constituant la phase aqueuse.

Nous avons vu que l'encapsulation d'un faible inoculum dans des goutte suivait la loi de Poisson (p.69), et que l'encapsulation d'inoculum plus élevés, la loi normale (figure 2.14 p.69). Cette figure démontre que le remplissage au nombre voulu est distribué autour de sa valeur. Par exemple si on souhaite encapsuler mille bactéries, ce serait fait à $\pm 3\%$ près ou si on veut cent bactéries, on aura une marge d'erreur de 10%.

Ce procédé alternatif de création d'échantillons biologiques se révèle être le plus simple à l'heure actuel. Les opérations fastidieuses des protocoles standards, limitent par elle-même la totalité des échantillons produits. La milli-fluidique digitale offre la possibilité de concevoir des échantillons en grand nombre et très simplement. Le nombre d'échantillons produits dépend du volume des gouttes conçues et de la longueur des capillaires dans lesquels on forme ces gouttes. Typiquement, lors de nos expériences (les débits sont conservés d'une expérience à l'autre pour travailler dans les mêmes conditions), nous produisons 450 gouttes (à 5% près) de 0,75 mm de longueur espacées entre elles de cette même longueur par mètre de capillaire de 0,5 mm de diamètre interne.

A l'échelle macroscopique, la tâche ardue pour produire un millier d'échantillons, nécessite un temps de préparation long, et est en majeure partie responsable de la nécessité d'un échantillonnage simplifié. En effet un expérimentateur courageux pourrait produire autant d'échantillon mais le temps pris pour remplir dix plaques de 96 puits est de plus de dix minutes. Les remplissages motorisés sont rarement utilisés car ils sont très onéreux. En chronométrant le remplissage manuel d'une plaque, cela a pris plus d'une dizaine de minute, ce qui veut donc dire

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

que remplir un millier de puits prendrait plus de dix minutes. En ce qui concerne l'encapsulation en goutte le temps nécessaire pour générer autant de réservoirs est au maximum de deux minutes.

En résumé, nous encapsulons en goutte un nombre moyen d'*E.coli*. Ces bactéries sont fluorescentes donc pour en mesurer la croissance, il faut utiliser un système de mesure de la fluorescence des gouttes.

3.3 Détection de la fluorescence en goutte

3.3.1 Module expérimental

La mesure de la densité de cellules est effectuée par la lecture de la fluorescence des individus. Le capillaire de transport des gouttes est monté sur un microscope en épifluorescence.

Pour fonctionner en fluorescence, un microscope comprend une source lumineuse et un bloc de filtres interchangeable situés sur le trajet lumineux (figure 3.5 p.91). La source lumineuse est une lampe à vapeur de mercure dont le rayonnement est filtré en longueur d'onde par le filtre d'excitation (entre 480 et 510 *nm* dans notre cas). Ce faisceau est dévié, et focalisé via un objectif, vers l'échantillon (ici une goutte) par un miroir dichroïque qui possède un fort coefficient de réflexion pour cette fenêtre de longueur d'onde. L'échantillon ainsi excité émet à son tour un signal lumineux dans une autre gamme de longueur d'onde. Le miroir dichroïque possède un fort coefficient de transmission pour la bande qui correspond au rayonnement fluorescent émis par l'échantillon. Ce rayonnement émis est sélectionné ensuite par un filtre d'émission (entre 530 et 570 *nm* dans notre cas), et poursuit son parcours à travers le chemin optique du microscope permettant ainsi la visualisation lumineuse émise par l'échantillon.

La source d'excitation est focalisée sur une portion du capillaire. La largeur de cette portion est de moins d'un millimètre. La mesure de l'intensité d'un si-

3.3. Détection de la fluorescence en goutte

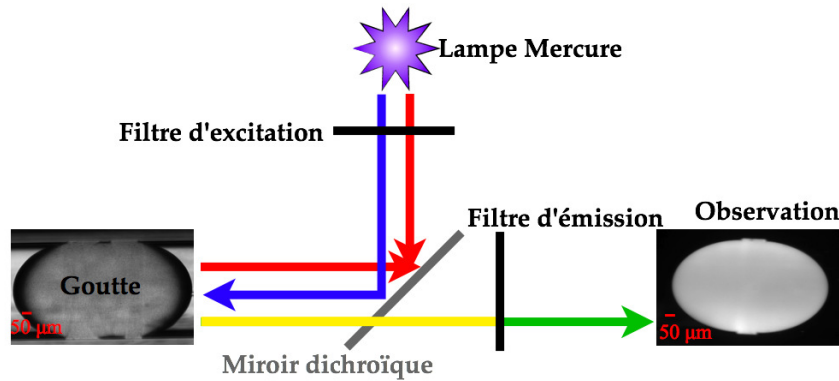


FIGURE 3.5 – Schéma du chemin optique du signal fluorescent d'un échantillon.

gnal lumineux d'une goutte est effectuée par un détecteur qui est un tube photomultiplicateur (PMT). Cet appareillage converti la lumière détectée en tension. Il est possible d'amplifier la tension mesurée en sortie au moyen de la variation de l'alimentation en tension du PMT (figure 3.6 p.92). Cependant, ce procédé amplifie également toute lumière parasite. Pour réduire cet effet, nous avons mis au point une chambre noire, contrôlée en température, enfermant le système de mesure.

La figure 3.6 (p.92) représente le gain du signal de sortie produit par l'excitation d'un fluorophore (la fluorescéine) en fonction de l'amplification de l'alimentation du PMT. La relation du signal d'une concentration en fluorescéine en fonction de l'amplification est une loi de puissance. Ce qui veut dire qu'il est possible d'accéder à une mesure de signaux lumineux de très faible intensité. La limite de détection est de 10^{-8} mol/L , en dessous de cette concentration en fluorescéine le signal ne sort jamais du bruit de fond. Et au-delà de 10^{-5} mol/L , le signal sature très vite le PMT (saturation à 10,6V). L'intensité lumineuse émise par les bactéries est faible et difficilement détectable, alors le PMT offre la possibilité d'accroître ce signal afin de pouvoir détecter et mesurer la présence de faibles densités de cellules.

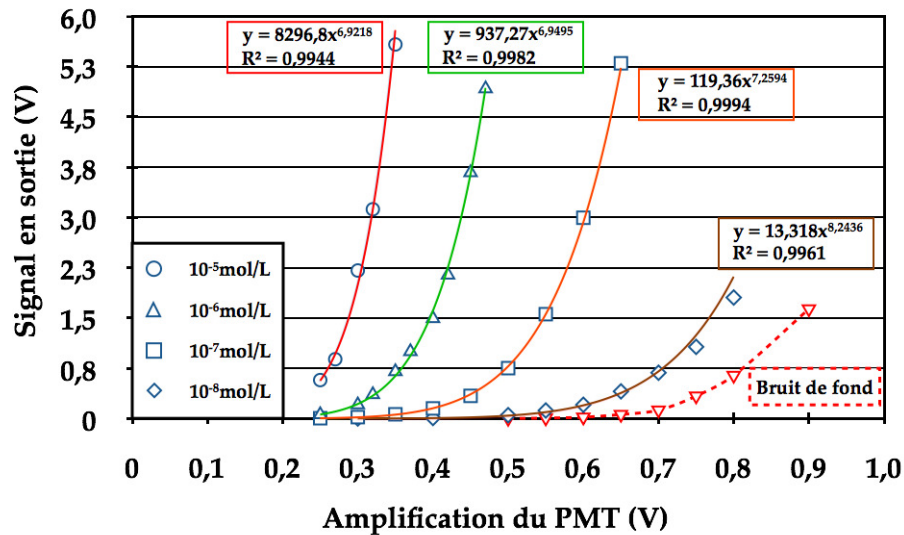


FIGURE 3.6 – Relation entre le signal mesuré de la fluorescéine et le gain imposé au PMT. Données obtenues pour différentes concentration en fluorescéine ainsi que pour l'huile HFE (bruit de fond).

3.3.2 Acquisition de la mesure de la fluorescence en goutte

Le PMT est connecté à un ordinateur par le biais d'une carte d'acquisition (DAQmx PCI-6221). Cette carte d'acquisition permet d'enregistrer le signal mesuré par le PMT à fréquence donnée et fixée par l'utilisateur. Le contrôle des paramètres d'acquisition est programmé sous LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench), environnement de programmation graphique développé par National Instrument©. LabVIEW permet de concevoir sa propre interface d'instrument virtuel paramétrant l'acquisition des données.

Une portion du capillaire de transport des gouttes est positionnée sur le microscope, de façon à ce que la source d'excitation incidente voit son plan focal centré au sein du capillaire (figure 3.7 p.93). De cette manière lorsqu'une goutte fluorescente circule dans le capillaire et passe dans la zone d'excitation, le rayonnement transmis par la goutte circule à travers le chemin optique du microscope et finit

3.3. Détection de la fluorescence en goutte

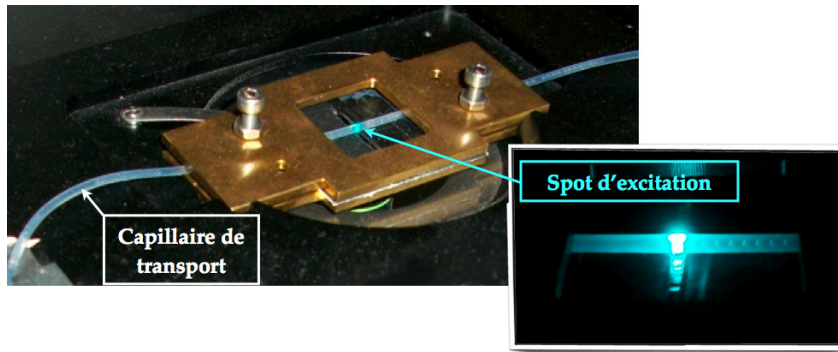


FIGURE 3.7 – Photographie de l'enceinte de détection. Le capillaire où sont formées les gouttes est fixé sur un support rigide.

par être captée par le PMT. Lorsqu'une goutte n'est pas dans le champ de détection, le signal mesuré est celui du bruit environnant, il est très faible comparé au signal fluorescent (figure 3.6 p.92). Le signal d'une goutte résulte de sa convolution avec le spot lors de son passage à travers le champ de détection. Ce signal décroît, jusqu'au niveau du bruit, lorsque la goutte termine son passage (figure 3.8 p.93).

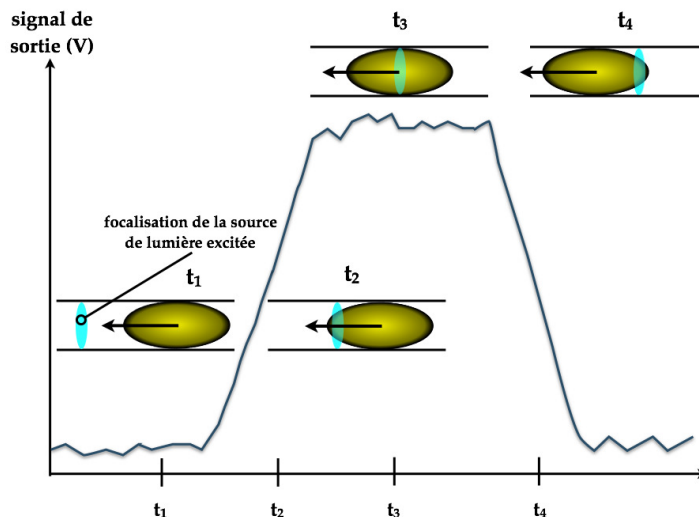


FIGURE 3.8 – Schématisation du passage d'une goutte à travers la zone de détection.

Ainsi le passage successif de différentes gouttes à travers le champ de détection

forme un signal périodique dont le minimum est l'espace entre les gouttes, et le maximum le signal propre à chaque goutte. L'interface que nous avons développé sur LabVIEW comptabilise les gouttes lorsque leurs signaux franchissent un seuil défini par l'utilisateur. Nous sommes donc capables de détecter le passage des gouttes en temps réel. En définitive, les mesures permettent d'acquérir le signal fluorescent propre à chaque goutte.

3.4 Manipulation de gouttes pour des mesures temporelles

Nous avons pour objectif de suivre l'effet d'une concentration donnée en antibiotique sur la croissance d'*E.coli*. Ce postulat force à établir cette croissance par la mesure de la dynamique du signal des échantillons. Ceci se traduit donc par la manipulation et la mesure du signal des milliers de gouttes au cours du temps.

Avoir un certain nombre de gouttes, N_g ($\simeq 1000$ dans notre cas), c'est former ces N_g tubes à essais dans un tuyau. Pour ce faire, il faut produire des gouttes et une fois le nombre N_g atteint arrêter leur conception en se servant d'une vanne pour stopper immédiatement le flux de la phase dispersée. Ceci permet de se focaliser sur la manipulation des N_g échantillons. Le maniement des gouttes, pour en mesurer la dynamique interne, se résume à amener les gouttes à maintes reprises devant le détecteur et en mesurer la fluorescence à chaque fois.

Avant de commencer la mesure des échantillons il faut sélectionner un train de gouttes. Car détecter N_g gouttes et arrêter leur production c'est concevoir $2 \cdot N_g$ gouttes, N_g de part et d'autre du détecteur (figure 3.9 p.95) (le champ de détection se trouve au milieu du capillaire de stockage des gouttes). On ne peut pas manipuler $2 \cdot N_g$ dans $2 \cdot L_c$ de capillaire, car on veut pas que les gouttes passent par des connexions (beaucoup de fragmentations aux connexions lors de longues manipulations). Ainsi, nous voulons manipuler N_g gouttes dans $2 \cdot L_c$ de capillaire. Pour sélectionner la moitié des gouttes, lorsqu'on arrête le flux de la phase aqueuse, on

3.4. Manipulation de gouttes pour des mesures temporelles

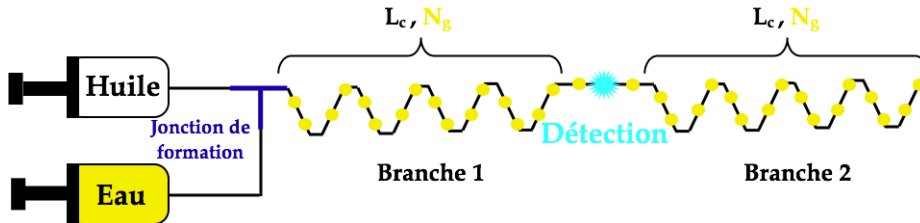


FIGURE 3.9 – Schématisation du circuit de formation des gouttes.

ne touche pas au flux de la phase continue. De cette façon, les gouttes poursuivent leur défilé devant le détecteur. C'est lorsque la dernière goutte passe devant le détecteur que le flux de la phase continue est stoppé ($2 \cdot N_g$ gouttes comptabilisées). C'est ainsi que nous produisons N_g échantillons, stockés dans la seconde branche. Les N_g gouttes comptabilisées initialement sont, de ce fait, évacuées. La configuration des gouttes d'émulsion est un train linéaire (à une dimension). Et la comptabilisation des gouttes permet leur identification par leur position dans le train. L'identification de chaque goutte est une étape essentielle lors des expériences. Le fait que les gouttes soient confinées en milli-fluidique tubulaire rend impossible la perte de leur identification.

Le but étant de faire une analyse de la dynamique interne des gouttes, il est essentiel de pouvoir faire repasser les N_g gouttes devant le détecteur après qu'elles aient stationnées dans une des branches. Par exemple, dans l'état où nous sommes restés, il s'agit de les faire circuler de la seconde branche vers la première. La première idée est d'aspirer les gouttes, d'autant que de nombreux pousse-seringue sont munis de cette option. Mais dans notre cas cela s'est avéré impossible. En effet, la viscosité de l'huile est très largement supérieure à la viscosité de l'air. Ceci signifie qu'il est beaucoup plus facile d'aspirer l'air ambiant au travers du piston des seringues, que l'huile des tubulures dès lors que l'étanchéité n'est pas parfaite. Au cours de nos expériences, nous avons observé la formation de bulles d'air au cours de l'aspiration. Les spécifications (d'étanchéité notamment) des seringues utilisées ne nous ont pas permis de les utiliser en mode aspiration. De ce fait nous

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

avons décidé de toujours pousser l'huile.

Le principe est le suivant : de la même façon que nous faisons circuler les gouttes de la première à la seconde branche, il va falloir connecter une seringue d'huile à l'extrémité de la seconde branche et ouvrir le circuit à l'extrémité de la première. Puis faire circuler le second flux d'huile de la seconde branche vers la première ce qui va de nouveau faire passer les gouttes devant le détecteur.

On utilise pour cela une vanne à trois voies déviant dans l'une ou l'autre des deux branches, le flux d'huile. Pour permettre à l'huile de pousser les gouttes devant le détecteur dans les deux sens, il faut avoir des évacuations qui peuvent être activées ou non. Pour cela les évacuations sont connectées à des vannes marche/arrêt (figure 3.10 p.96).

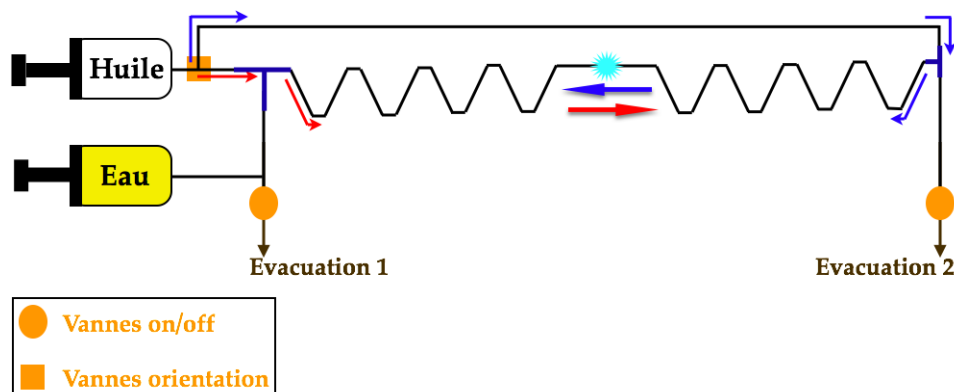


FIGURE 3.10 – Schématisation du circuit de détection par alternance du sens de poussée de l'huile.

Pour faire circuler les gouttes de la seconde branche à la première, il faut que la vanne trois voies oriente l'huile dans le sens de poussée bleu (figure 3.10 p.96) et que la vanne de la seconde évacuation soit fermée et la première ouverte. Et au contraire pour faire circuler les gouttes dans l'autre sens, il faut que la vanne trois voies oriente le flux dans le sens rouge (figure 3.10 p.96) et que la première vanne d'évacuation soit fermée et la seconde ouverte. En alternant l'ouverture et

la fermeture combinée des vannes d'orientation et on/off, il est donc possible de faire circuler les gouttes devant le détecteur dans un sens ou dans l'autre.

L'utilisation d'électrovannes permet d'automatiser la mesure sur plusieurs heures. La création d'un programme LabVIEW permet de paramétrer et contrôler les vannes connectées à l'ordinateur via une carte possédant des interrupteurs on/off (DAQmx PCI-6520). Ce programme complète celui du comptage des gouttes afin de procéder aux mesures et manipulations des échantillons de manière complètement automatisée. Il enregistre dans un fichier les mesures de tension effectuées pendant le passage des gouttes, durant toute la période d'incubation fixée par l'expérimentateur.

A la fin des mesures nous obtenons plusieurs fichiers correspondant aux nombres de passages devant le détecteur qu'ont effectuées la totalité des gouttes. Ces fichiers sont composés d'une série de nombres correspondant aux mesures de tensions en sortie du PMT à une amplification donnée. Par traitement des mesures, on peut attribuer à chaque goutte son propre signal au cours du temps. Car le fait de travailler en capillaire (à une dimension) permet de ne pas perdre l'identité de chaque goutte labellisée par sa place dans le train.

3.5 Séparateur

Nous avons pu observer qualitativement, que la manipulation de nombreuses gouttes sur de longues durées favorise le rapprochement des gouttes entre elles. Ce qui fait qu'un train de gouttes initialement distinctes et à une certaine distance de leurs voisines, finissent en paquets de plusieurs gouttes après quelques heures d'expériences.

L'origine de ce phénomène réside dans le couplage de la fréquence d'écoulement des gouttes avec leurs interactions hydrodynamiques [17]. Il est démontré que lorsque les gouttes sont advectées dans un réseau fluide, elles réduisent

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

localement la conductance du réseau, ce qui induit une redistribution dynamique de l'écoulement du fluide. Ces perturbations hydrodynamiques produisent des interactions non-locales avec les objets en mouvement, une goutte ralentissant ses poursuivantes directes. La principale conséquence de cet effet est la révélation d'une fréquence critique de défilement de gouttes, au-delà de laquelle l'écoulement n'est pas stationnaire : il y a carambolage entre les gouttes (figure 3.11 p.98).

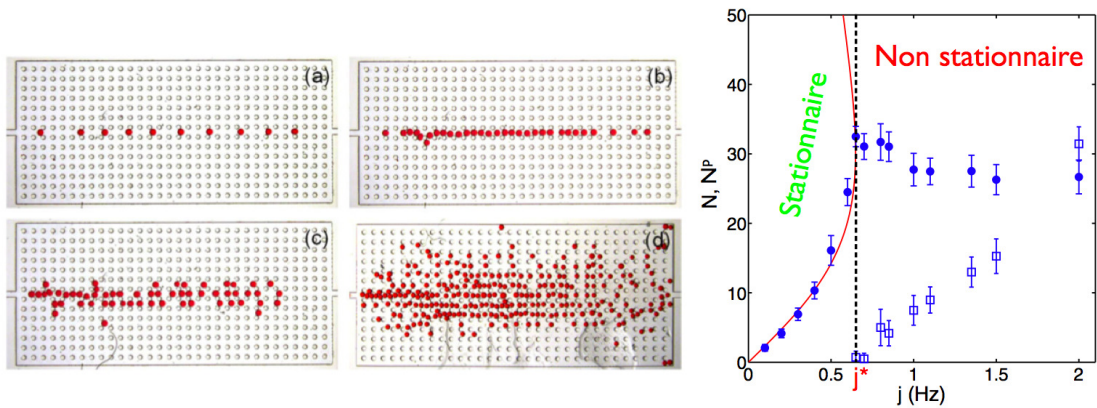


FIGURE 3.11 – Photographies de gouttes dans le réseau micro-fluidique en fonction de leur fréquence j d'écoulement. (a) : $j = 0,4 \text{ Hz}$. (b) : $j = 0,7 \text{ Hz}$. (c) : $j = 2 \text{ Hz}$. (d) : $j > 2 \text{ Hz}$. L'écoulement sans bouchon (a) suit la trajectoire unique de l'écoulement d'une goutte seule, et distribue N gouttes dans le canal principal (N : ronds pleins du graphique). Tandis que dès qu'il y a un bouchon la totalité des gouttes est divisée selon N gouttes dans le canal principal et N^p gouttes dans les canaux perpendiculaires (N^p : carrés vides du graphique). $j^* = 0,6 \text{ Hz}$ [17].

La figure montre que lorsque la fréquence de défilement des gouttes est inférieure à la fréquence critique, les gouttes circulent sans carambolage (figure 3.11.a). Mais, dès lors que la fréquence de défilement dépasse cette fréquence critique, le carambolage est inévitable.

Dans notre cas, pour accomplir les mesures de la dynamique de croissance des bactéries, les gouttes circulent longuement dans un capillaire. Elles finissent inexorablement par se rapprocher les unes des autres jusqu'au contact. La coalescence entre les gouttes est limitée par la présence du tensioactif, mais elle peut finir par

3.5. Séparateur

s'opérer. La coalescence pose souci car elle fait perdre l'indépendance des réservoirs fusionnés. Avant même la coalescence, cet empagement est un problème en ce qui concerne l'attribution d'un signal propre à sa goutte. La proximité des gouttes ne

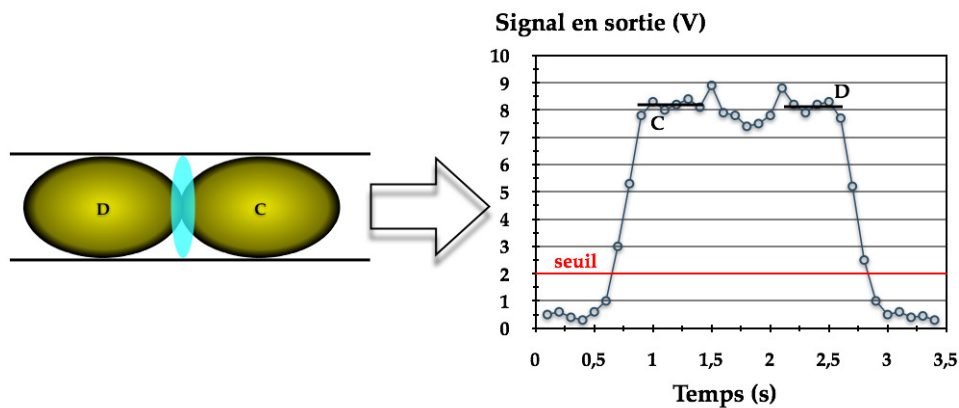


FIGURE 3.12 – Schématisation du rapprochement entre deux gouttes et mesure du signal fluorescent de gouttes à $10^{-7}mol/L$ en fluorescéine pour une amplification de 0,65V du PMT.

permet pas de les distinguer lors de la mesure par fluorescence (figure 3.12 p.99).

On pourrait envisager d'espacer suffisamment les gouttes pour réduire la fréquence de défilement, afin de ne jamais avoir de paquet. Mais dans ce cas, on aurait peu de gouttes dans des tubes très longs. On a trouvé une alternative pour forcer les gouttes à rester espacées : on insère une goutte, de phase immiscible vis à vis des phases continue et aqueuse utilisées [10, 20, 53, 60, 87]. En utilisant une jonction en croix comme géométrie de formation, on peut amener simultanément à la jonction les trois phases immiscibles (figure 3.13 p.100).

L'air est souvent utilisée comme espaceur [10, 20, 53, 60], mais dans notre cas c'est une mauvaise idée car il est en partie soluble dans l'huile HFE et surtout il possède une forte compressibilité. La phase immiscible utilisée est l'huile minérale (M5904 Sigma-Aldrich) (figure 3.14 p.100). Il a été observé qualitativement que cette huile ne pouvait être utilisée qu'en présence du tensioactif PFPE-PEG dans

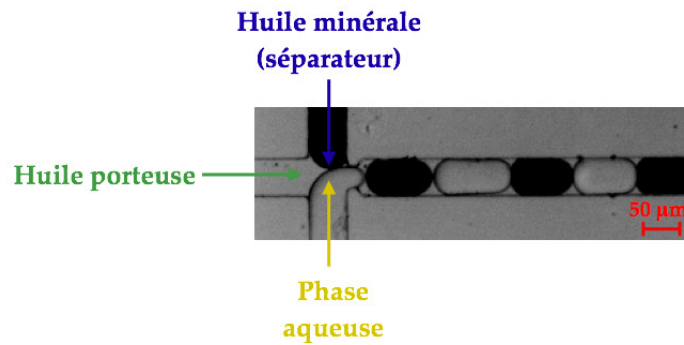


FIGURE 3.13 – Photographie de la formation d'émulsion d'eau avec séparateur en géométrie micro-fluidique.

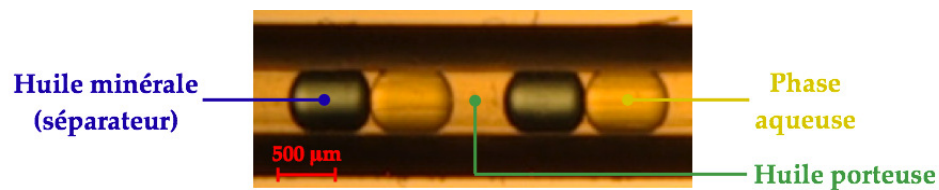


FIGURE 3.14 – Photographie du système milli-fluidique utilisé.

l'huile HFE. Car en l'absence du tensioactif, on produisait une double encapsulation, eau dans huile minérale dans huile fluorée.

L'ajout des séparateurs a permis de résoudre les troubles engendrés par l'empaquage de goutte. Nous pouvons conclure sur le fait que nous avons mis au point un instrument capable de manipuler pendant plusieurs heures un millier d'échantillonsensemencés d'organismes et capable d'enregistrer l'activité des bactéries au cours de leur période d'incubation.

3.6 Croissance d'organismes en gouttes

Nous procédons à la mesure de la croissance d'un inoculum en goutte afin de tester le procédé de mesure que nous avons mis au point. Au préalable, nous fixons des paramètres pouvant varier d'une expérience à une autre. Ici, nous incubons, à

3.6. Croissance d'organismes en gouttes

37°C, 1481 gouttes d'inoculum de dix cellules par goutte (à ± 3 bactéries par goutte selon la théorie : figure 2.15 p.70). La fréquence d'acquisition du PMT est de 250 Hz, et l'amplification à 0,62 V. Cette expérience aura duré au total douze heures.

3.6.1 Méthode de traitement des données

Tout d'abord, les fichiers sont enregistrés comme une suite de nombres acquies à la fréquence de mesure du PMT. Etant donnée la grande quantité de points mesurés, les fichiers sont traités par programmation sous MATLAB®.

Les fichiers correspondants à chaque passage sont ouverts un à un, permettant d'observer les signaux produits par le passage des gouttes devant le détecteur (figure 3.15 p.101). La figure montre deux exemples d'accumulation des signaux

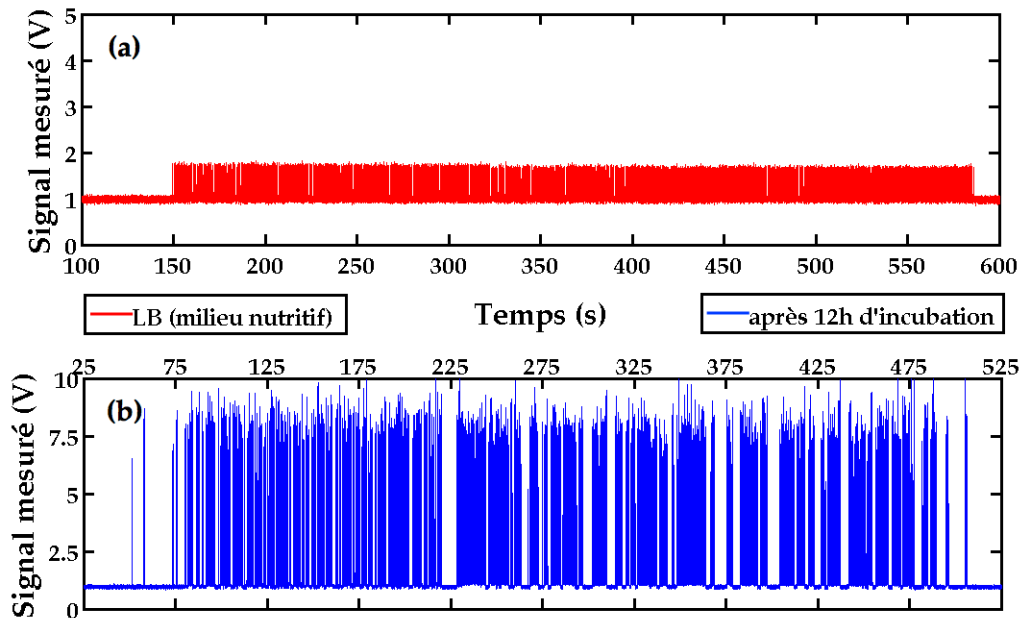


FIGURE 3.15 – Signaux bruts des 1481 gouttes, pour une amplification du PMT à 0,62V. Mesures effectuées à différents temps d'incubation (a) : à $t = 0$, mesure du milieu nutritif - (b) : à $t = 12h$, mesure de la croissance.

des gouttes défilant devant le détecteur. Le signal du milieu nutritif est considéré

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

comme le signal au temps $t = 0$. On note que ce signal augmente de manière significative après une période d'incubation de douze heures. Cet effet provient de l'augmentation de la densité de cellules dans les gouttes.

Afin de s'assurer que l'augmentation du signal est engendré par la multiplication des organismes, il faut analyser les données acquises au cour de chaque passage. Pour y procéder, il faut identifier chaque goutte et lui attribuer son signal au fil du temps. De la même manière que pour le comptage des gouttes sur LabVIEW, les variations de tensions dues au passage des gouttes sont détectées par seuillage, et les gouttes sont à nouveau identifiées par leurs positions dans le train. A chaque passage, chaque gouttes est comparée à son signal initial. Nous définissons l'amplitude du signal des gouttes comme le signal émis par les bactéries (figure 3.16 p.102). L'amplitude est déterminée en effectuant la différence entre le

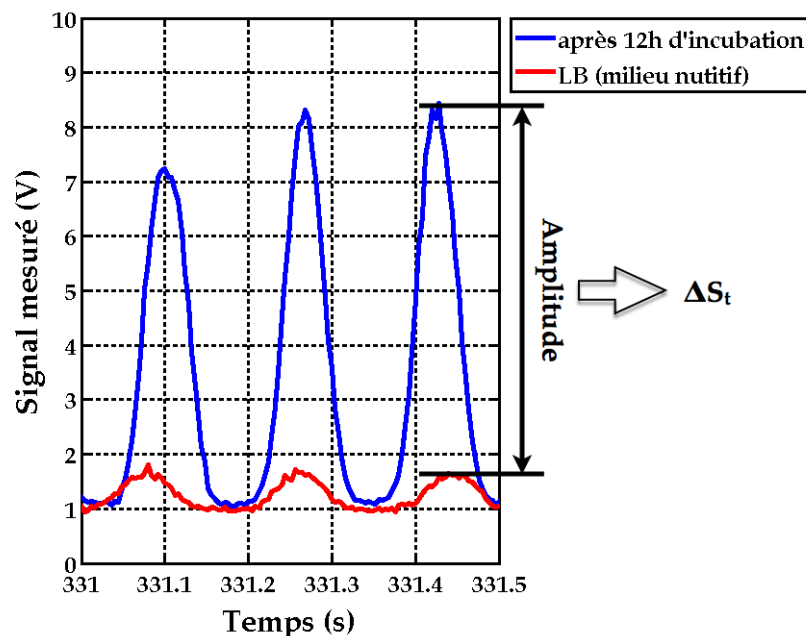


FIGURE 3.16 – Signaux de trois gouttes au temps $t = 0$ et près douze heures d'incubation.

signal de la goutte au temps du passage, et son signal initial (au temps $t = 0$).

3.6. Croissance d'organismes en gouttes

Une certaine densité de population possède une variation de signal comparé au LB qui lui est propre. Plus la population est importante, plus l'amplitude du signal est élevée. Donc, au cours du temps, puisque les bactéries se multiplient, le signal produit augmente corrélativement à la taille de la population. Nous avons calibré le signal produit par la population bactérienne en fonction de sa densité, à différentes amplifications du PMT (figure 3.17 p.103). La variation de tension de

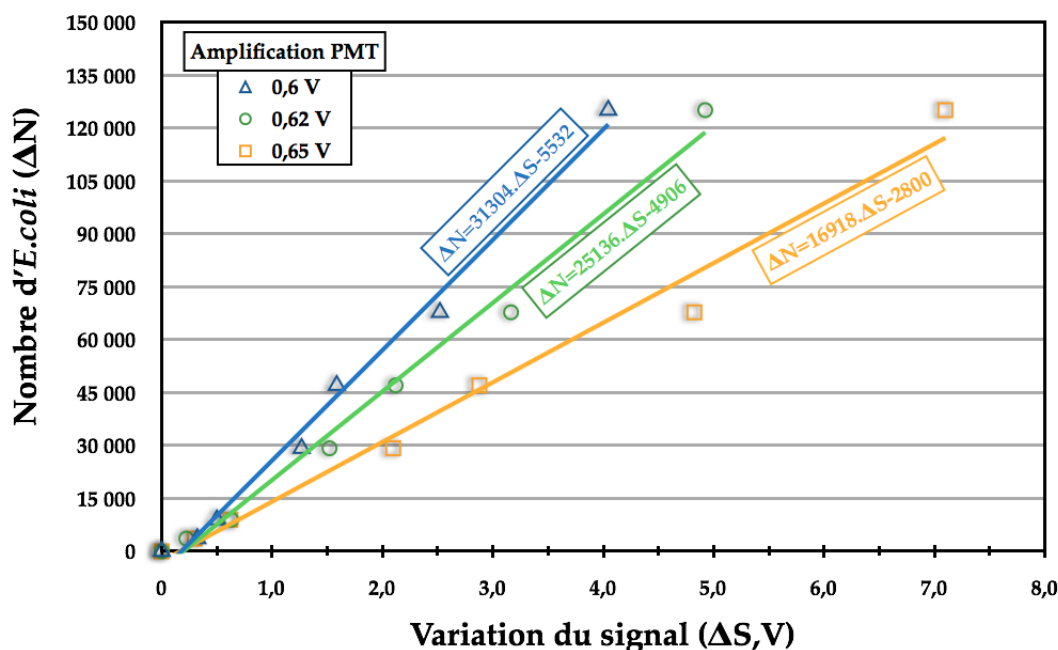


FIGURE 3.17 – Relations entre la variation du nombres d'organismes encapsulés en goutte et la variation du signal engendré à différentes amplifications.

sortie à l'instant t , ΔS_t (dépendante de l'amplification du PMT) se déduit de la différence entre le signal mesuré à t , S_t et le signal à $t = 0$: le signal du LB , S_{LB} . La variation du signal est liée à la variation de la taille de la population, ΔN_t , lui correspondant par :

$$\Delta N_t = a + b \cdot \Delta S_t \quad (3.2)$$

La variation du signal est produit par N_b bactéries en assez grand nombre pour être distinguées du niveau de fluorescence produit par le LB . Lorsqu'il n'y a pas

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

assez de bactéries dans le milieu, il est impossible d'engendrer une variation du signal et $\Delta S_t = 0$. Si on introduisait aucune bactérie dans le milieu, on produirait exactement le même effet nul sur la variation du signal. Ces considérations permettent de définir la limite de détection du nombre d'organismes :

$$N^* = -a$$

Amplification du PMT (V)	0,60	0,62	0,65
Limite de détection (<i>E.coli</i>)	5532	4906	2800

TABLE 3.1 – Limite de détection du nombre d'*E.coli* en fonction de l'amplification du PMT. Mesures expérimentales cohérentes.

En résumé, nous avons établi le lien entre le signal acquis et le nombre d'*E.coli* en goutte. Nous avons accès au nombre de cellules dans chaque goutte à différents de temps de mesures.

3.6.2 Analyse des données

L'analyse de l'amplitude de chaque goutte permet de connaître l'évolution du signal produit par les bactéries en fonction de la période d'incubation. La calibration (figure 3.17 p.103) nous donne accès aux courbes de croissance dans tous les réservoirs, une fois la limite de détection franchie (figure 3.18 p.105).

Ce type d'expérience a été reconduite et s'avère reproductible. Ces courbes expérimentales sont d'aspect caractéristique de la croissance exponentielle. On distingue la phase exponentielle et la saturation. La phase de latence n'est pas observée, la période pré-exponentielle correspond au temps mis par les organismes pour dépasser le niveau de fluorescence du *LB*.

Il est possible d'estimer le temps de division par la régression linéaire de la phase exponentielle par : $\ln(N(t)) = a + b \cdot t$ (figure 3.19 p.106). Cela nous permet

3.6. Croissance d'organismes en gouttes

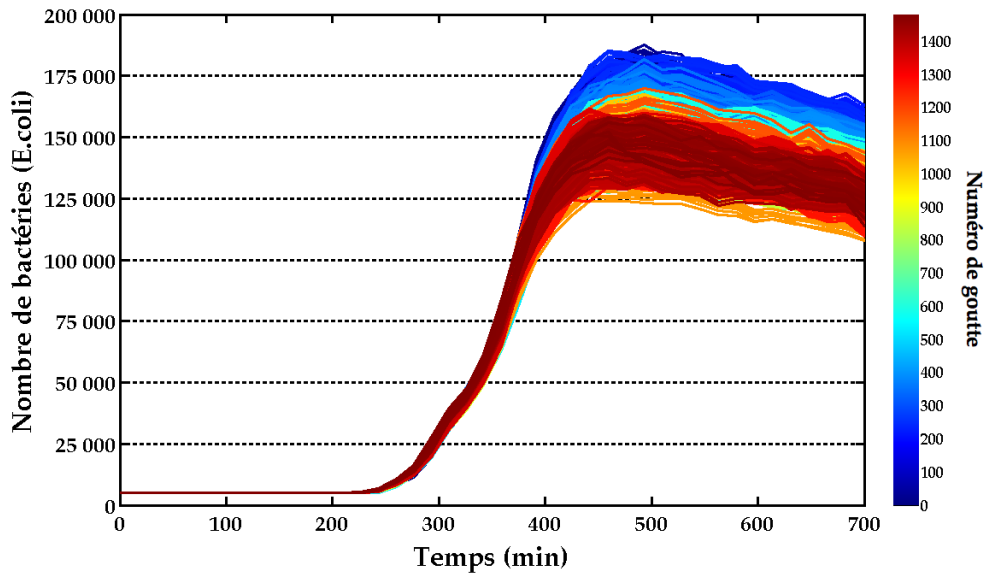


FIGURE 3.18 – Mesure de la croissance. Population bactérienne présente en goutte en fonction du temps.

d'en déduire :

$$N(t) = n_i \cdot e^{b \cdot t}$$

Selon le modèle théorique de la phase exponentielle (équation 1.1 p.11) on peut écrire :

$$\begin{aligned} e^{b \cdot t} &= 2^{t/\tau} \\ \Rightarrow \tau &= \frac{\ln 2}{b} \end{aligned} \quad (3.3)$$

Les mesures expérimentales donnent accès au temps de division d'*E.coli* en goutte. Il est possible d'observer la répartition des temps de divisions dans les réservoirs (figure 3.20 p.107).

Les taux de croissance des organismes sont distribués autour de 34 *min*, pour un écart-type de 41 *s*. Si l'on s'en réfère à la croissance en volume macroscopique à cette température, *E.coli* se divise en 30 *min*. Ce temps de génération est proche de celui mesuré en goutte. La différence peut s'expliquer par la limitation de l'apport en dioxygène dans les gouttes, qui ralentit légèrement le temps de division.

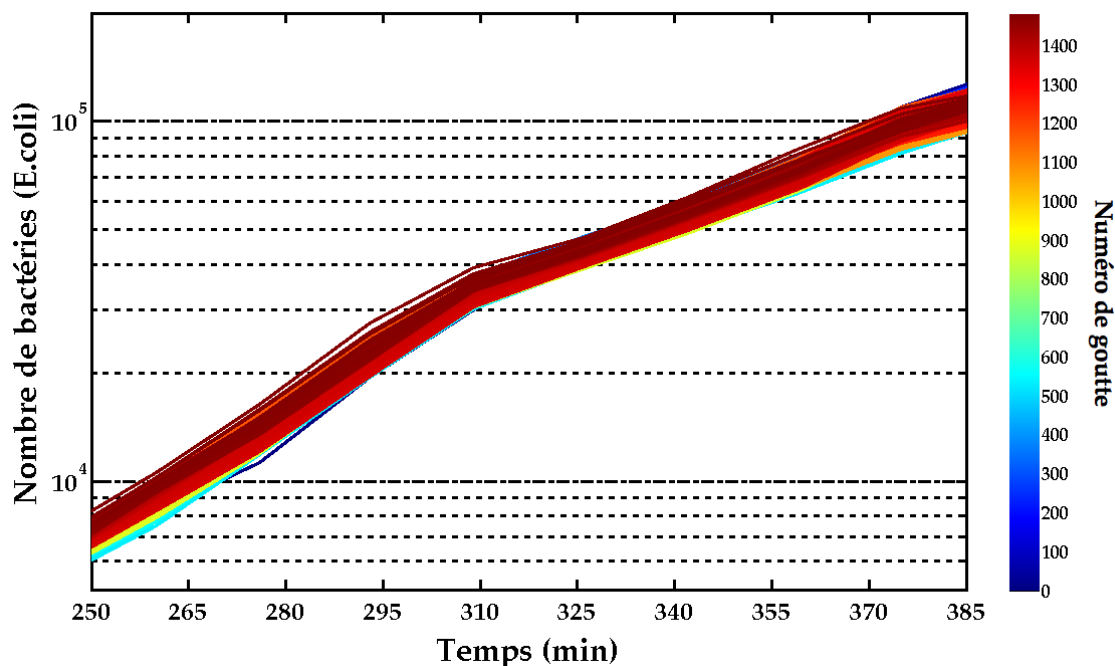


FIGURE 3.19 – Population bactérienne présente en goutte pendant l'intervalle de temps correspondant à la phase exponentielle. Les courbes tendances sont estimées entre 250 et 385 *min*.

Les expériences de croissance menées permettent de valider le concept expérimental. Il nous est possible de concevoir, manipuler et mesurer des échantillons de façon automatisée. Il est également possible d'analyser la dynamique interne de chaque réservoir, ainsi que d'en extraire des paramètres biologiques, comme la densité de population et leur taux de division. L'objectif final étant de mesurer la concentration minimale en antibiotique inhibant la croissance, il nous faut introduire cet antibiotique en goutte.

3.7 Création d'un gradient d'antibiotique

Nous avons vu (figure 2.9 p.66) qu'il est possible de contrôler finement la composition interne des gouttes par la manipulation des flux des réactifs de la phase dispersée. Nous nous sommes servi de ce concept pour concevoir un gradient de

3.7. Création d'un gradient d'antibiotique

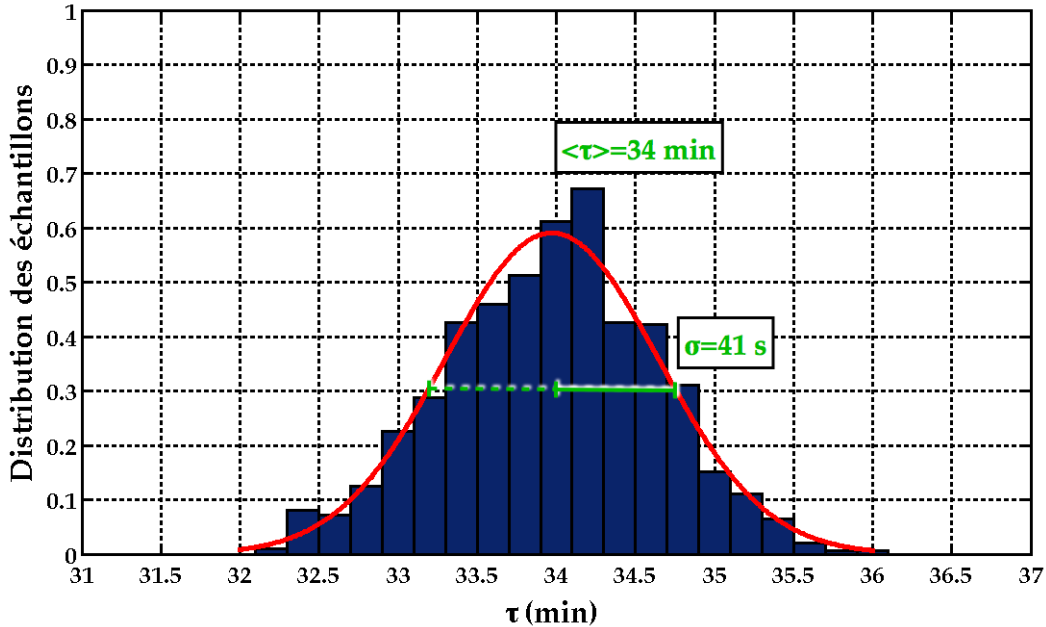


FIGURE 3.20 – Distribution des temps de divisions normalisés par la densité des temps de division parmi les 1481 gouttes. En rouge, la Gaussienne de la distribution expérimentale.

concentration en antibiotique au sein du train de goutte.

3.7.1 Marquage fluorescent de la concentration en antibiotique

On détermine initialement la quantité d'antibiotique présente en goutte. Pour chaque goutte constituant un micro-réacteur, l'idée est de la corrélérer avec une quantité de fluorophore correspondante ($C_{antibio} \propto C_{fluor}^0$). Cette dernière peut être déterminée par mesure de l'intensité de fluorescence. Ce raisonnement est validé par le fait que ces deux composants sont injectés par la même source. Toutefois, dès que les bactéries entament leurs divisions dans une goutte, le signal de fluorescence est modifié. Celui-ci n'est plus proportionnel alors à la quantité d'antibiotique dans la même goutte.

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

En résumé, la quantité d'antibiotique est calibrée par la mesure de fluorescence initiale de chaque goutte, à l'aide de micro-sphères fluorescentes. Et l'identification des gouttes est couplée avec sa concentration en antibiotique.

3.7.2 Principe

Pour une goutte formée donnée, nous aurons une fraction α , en fluorophore (colloïdes fluorescentes + *LB* + antibiotique) et une fraction $(1 - \alpha)$ en *LB*. La fraction de fluorophore est proportionnelle à la quantité d'antibiotique. En conséquence, pour varier de façon continue la quantité d'antibiotique dans chaque goutte, nous devons faire varier la quantité en fluorophore. Pour cela, nous pouvons former un train de goutte dans lesquelles la quantité en fluorophore décroît de façon continue.

Expérimentalement, cela revient à travailler à débit total, Q_t , fixé tout en variant les débits du *LB* et de fluorophore comme le montre la figure 3.21 (p.108). Concrètement, le débit de fluorophore, Q_f , est fixé à $\alpha \cdot Q_t$ et le débit du *LB*, Q_e ,

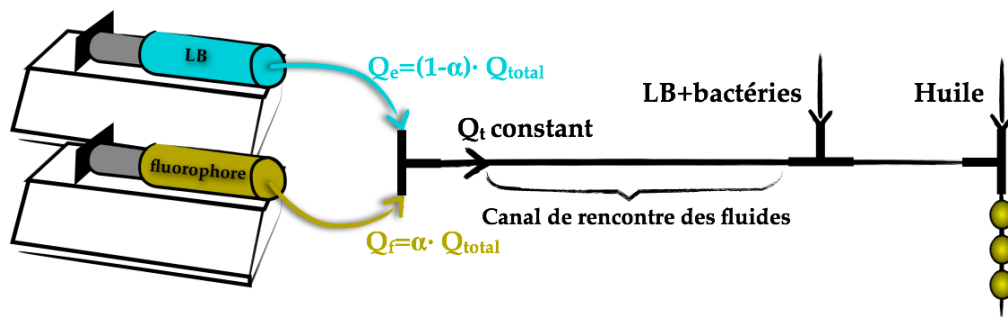


FIGURE 3.21 – Schéma de dilution d'un réactif par contrôle des flux. Suivi de l'encapsulation de bactéries par conception des gouttes.

vaut $(1 - \alpha) \cdot Q_t$. Avec ce paramétrage on peut faire varier continuellement α de 0 à 1 et en conséquence couvrir toutes les gammes d'antibiotique. Conceptuellement, comme montré sur la figure 3.22 (p.109) les deux fluides s'écoulent, sans se mélanger, en formant un gradient de fluorophore (et donc d'antibiotique). Notons au

3.7. Création d'un gradient d'antibiotique

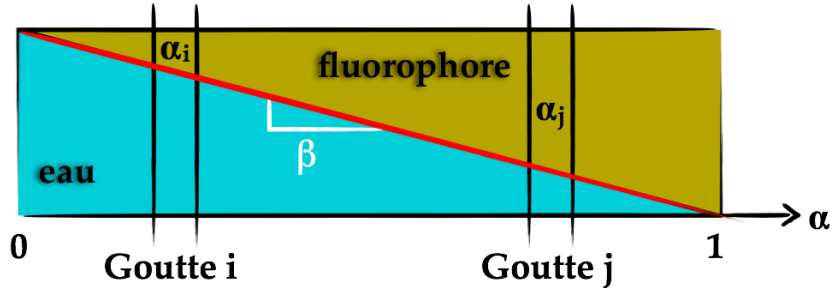


FIGURE 3.22 – Schématisation de la formation du gradient dans le canal de rencontre des fluides.

passage que les temps de diffusion de fluides miscibles sont très longs [3] et que le mélange s'effectue dans les gouttes. Maintenant, lorsque ce profil d'écoulement arrive au niveau de la jonction en T, suivant le débit d'huile, des gouttes sont formées avec des quantités d'antibiotiques différentes et connues selon leur position relative dans ce profil. Effectivement, comme représenté dans l'exemple à la figure 3.22 (p.109), les gouttes i et j ont des compositions d'antibiotiques différentes et connues dans le profil.

Toutefois, expérimentalement le point le plus important est le contrôle de la dynamique de changement des débits. Toujours dans l'exemple de la figure précédente, cela correspond au contrôle du paramètre β . Ici, nous avons représenté le cas d'une décroissance linéaire du débit d'antibiotique qui est le choix expérimental.

3.7.3 Exemple de dynamique de gradient

Le découpage du profil en goutte se fait suivant la fréquence de formation de celles-ci. Nous travaillons à débit d'huile et de phase dispersée fixés.

La figure 3.23 (p.110) montre que le contrôle de la pente de dilution (β) permet d'enregistrer le gradient sur un nombre de gouttes fixé. Dans le canal de rencontre des fluides, β peut être plus ou moins élevé. Par exemple, pour une pente β raide, le gradient peut être stocké sur un faible nombre de gouttes. En résumé, le paramètre

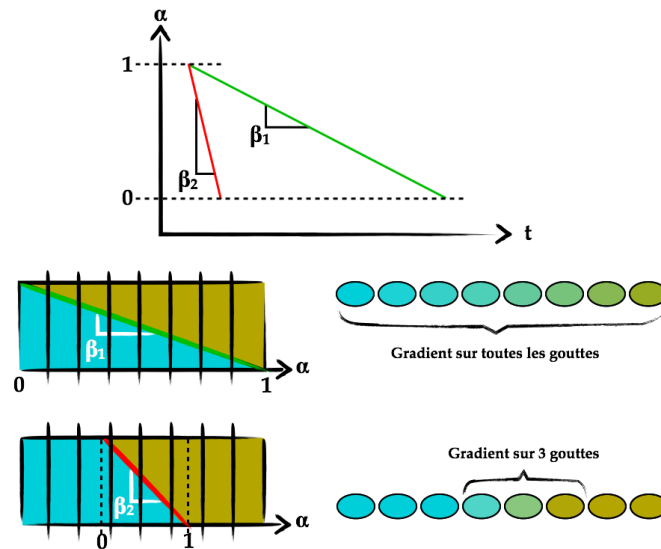


FIGURE 3.23 – Schématisation de la formation du gradient dans les gouttes en fonction du paramètre β .

β permet donc de définir le nombre de gouttes constituant le gradient (figure 3.24 p.111).

Cependant, le nombre de gouttes du gradient dépend aussi de la longueur du tube d'écoulement de celles-ci. La figure 3.25 (p.112) montre cinq expériences de composition d'un gradient. Celles-ci sont effectuées dans deux longueurs de capillaires, et on y voit que le gradient ne suit pas la consigne. En fonction de cette longueur le nombre de goutte enregistrant le gradient n'est pas le même. Pour 10 m de tubes le gradient est suivi par 2500 gouttes, et dans 1 m par 700 gouttes. Cet effet s'explique par l'augmentation de la résistance hydrodynamique, R_h , du système. Elle dépend de la longueur de capillaire, L_c , composant le système par (dans le cas de capillaires cylindriques de rayon r) :

$$R_h = \frac{8 \cdot \mu \cdot L_c}{\pi \cdot r^4}$$

3.7. Création d'un gradient d'antibiotique

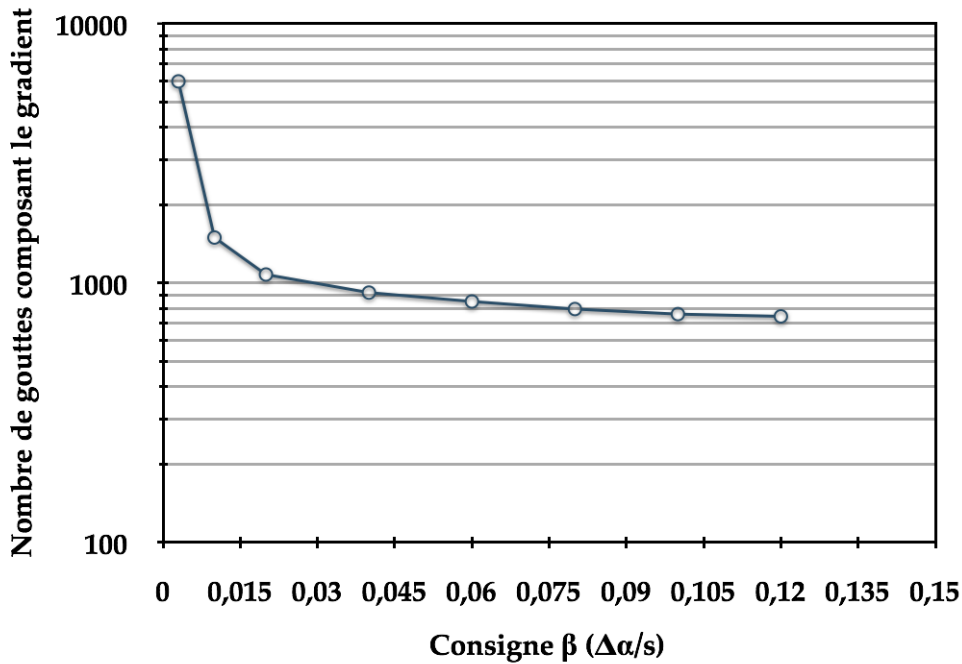


FIGURE 3.24 – Représentation du nombre de gouttes composant le gradient complet en fonction de la consigne β . β fait varier α de 0 à 0,1 selon le temps imparti pour former les gouttes à la fréquence de 13 Hz .

Et la pression à imposer, ΔP , pour faire écouler les fluides à débit, Q vaut :

$$\Delta P = R_h \cdot Q$$

En conséquence, lorsqu'on augmente la longueur de capillaire, on augmente la pression absolue mise en jeu pour mettre les fluides en mouvement.

Ces calibrations nous permettent de choisir les paramètres que nous voulons en fonction de la longueur capillaire, qu'il faut pour contenir environ mille gouttes composant le gradient. Finalement, les bactéries sont incorporées avant la formation des gouttes au moyen d'une jonction en T connectée au canal de rencontre des fluides. De la même façon le mélange n'a pas lieu avant l'encapsulation. Il est important de noter que le débit du flux de bactéries est constant, afin de toujours

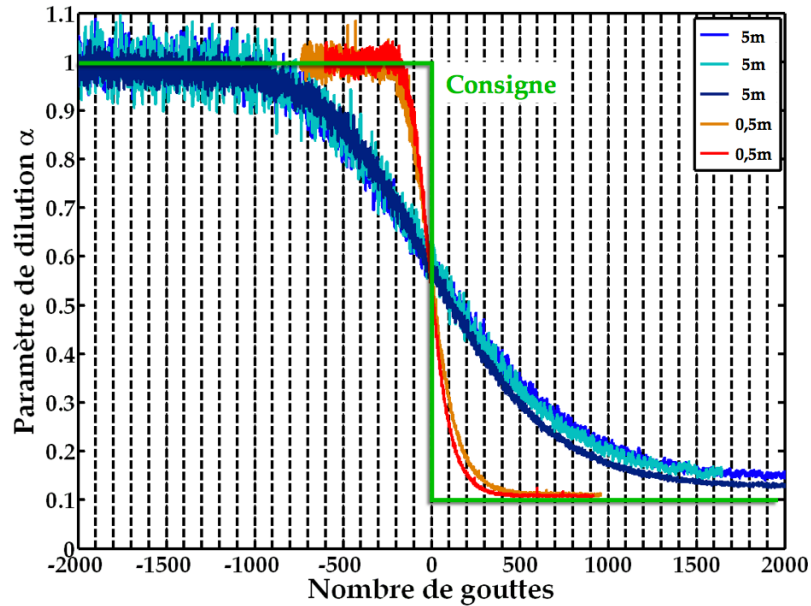


FIGURE 3.25 – Représentation de l'effet de la longueur du capillaire sur la dilution. La consigne β étant de faire varier α de 0 à 0,1. Le nombre de gouttes composant le gradient est centré en son milieu.

enfermer le même inoculum.

Conclusion du chapitre

L'outil développé lors de cette thèse permet de co-encapsuler un nombre déterminé de cellules dans des gouttes de tailles contrôlées, avec une concentration en antibiotique. La dilution en continu d'un antibiotique ainsi que la discrétisation en goutte implique que la résolution sur la gamme de concentrations étudiées est forte. Ce qui répond aux attentes de mesures d'une CMI de façon plus précise. Et cela permet d'envisager la mesure de la CMI du céfotaxime sur *E.coli* par l'instrument que nous avons mis au point.

Cet outil permet également de mesurer la dynamique interne des gouttes. Ceci s'effectue par la mesure du signal fluorescent de chaque goutte au cours du temps. Les mesures permettent d'observer l'évolution d'une population d'organismes fluorescent au cours du temps. Les courbes de croissance, ainsi établies, révèlent le comportement bactérien en goutte et sans contraintes.

En définitive, nous avons à notre disposition un outil d'échantillonnage et de mesure de l'activité bactérienne. Il est possible de soumettre un nombre déterminé d'organismes à différentes intensités connues de stress antibiotique au sein d'une même expérience.

Nous avons développé une procédure de mesure complètement automatisée. Nous allons donc étudier, si il existe, l'effet de l'inoculum sur la CMI.

Chapitre 3. Matériel et méthode de mesure de l'activité biologique

Résultats et discussions

Chapitre 4

Inhibition de la croissance bactérienne.

Chapitre 4. Inhibition de la croissance bactérienne.

Dans ce chapitre nous présenterons le concept global appliqué à toutes les expériences afin de déterminer la CMI du céfotaxime sur *E.coli*. Les expériences ont pour but de quantifier l'effet qu'à la taille de l'inoculum sur la valeur de la CMI. Nous discuterons ensuite de cet effet.

4.1 Détermination de la CMI du céfotaxime

Comme décrit dans le chapitre précédent, nous marquons une concentration en antibiotique par une intensité fluorescente. Les fluorophores utilisés sont une dispersion de colloïdes fluorescentes (de $3\ \mu\text{m}$ de diamètre). La dilution en continue des collides par le *LB* donne le profil de l'intensité fluorescente initiale du train de goutte (figure 4.1 p.118).

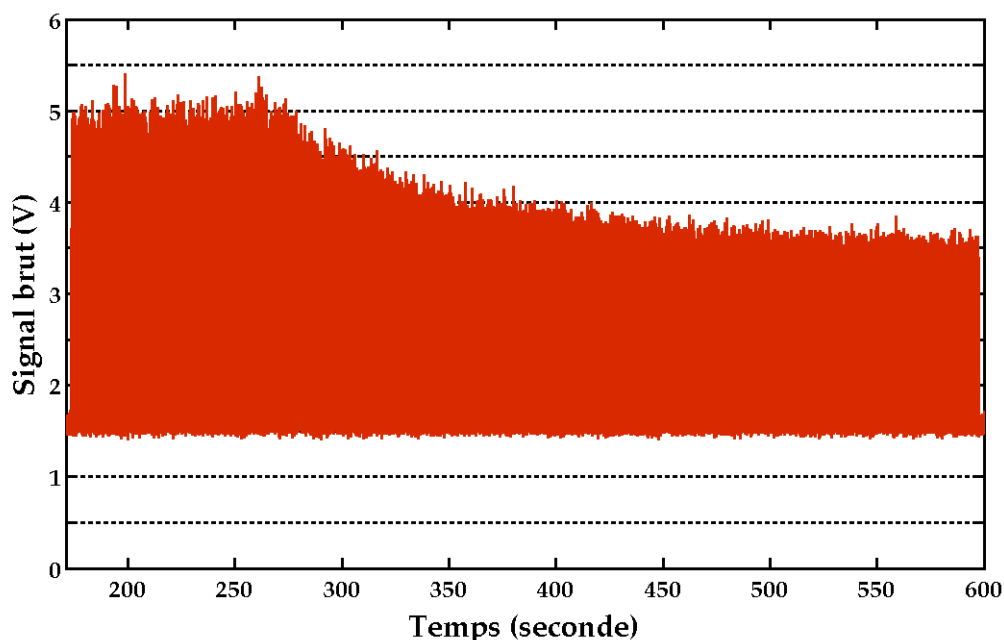


FIGURE 4.1 – Tracé initial d'un train de 1296 gouttes, amplification : 0,65V. L'inoculum moyen en goutte est de cent *E.coli*. La concentration en céfotaxime varie de 0,005 à 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Chaque goutte est identifiée par la technique de seuillage et marquée de son

4.1. Détermination de la CMI du céfotaxime

intensité fluorescente initiale. Ceci nous permet d'attribuer à chaque échantillon sa concentration en céfotaxime (figure 4.2 p.119). Nous avons choisi d'échantillonner

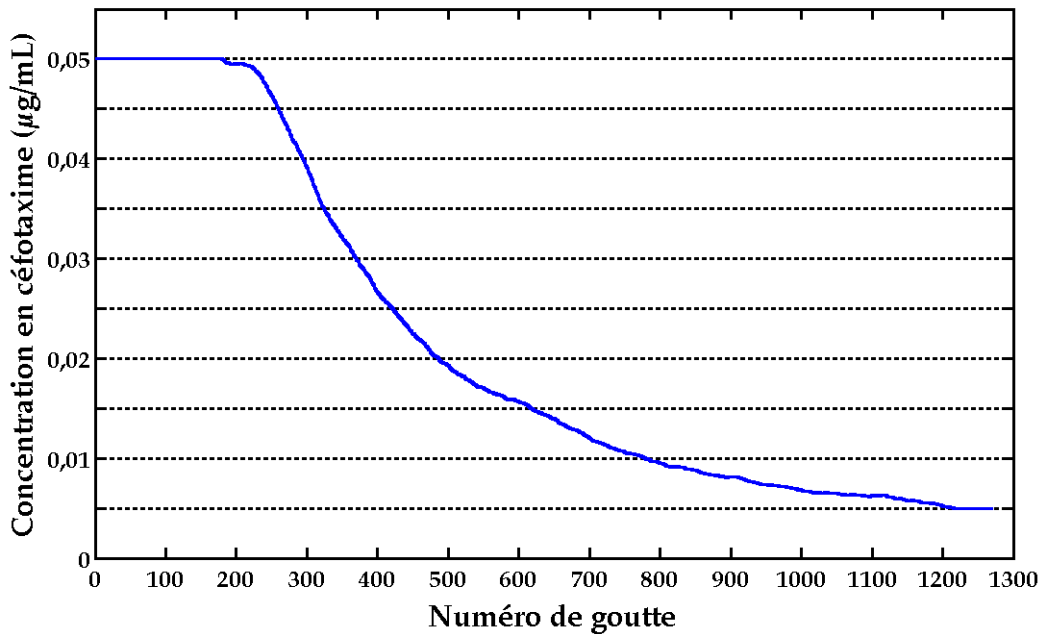


FIGURE 4.2 – Tracé de l'attribution de la concentration en antibiotique à chaque goutte de la figure 4.1 (p.118). La résolution en concentration dans ce train est de l'ordre de $10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$.

le gradient de concentration en antibiotique sur un nombre de gouttes inférieur au nombre du gouttes constituant le train.

Techniquement, nous formons les gouttes dans sept mètres de capillaires, mais les stockons et manipulons sur 3,5 m, ce qui permet de contenir environ 3000 gouttes. Sachant que nous avons des espaceurs, nous produisons au final environ 1500 gouttes d'intérêt. Nous contrôlons la pente de dilution (β) pour produire un gradient de concentration dans mille gouttes (sur les 1500). Il est plus sûr de faire cela que de tenter d'avoir le gradient sur toutes les gouttes. En effet, la sélection du train (section 3.4 p.94) s'effectue en fonction du nombre de gouttes qu'on a préalablement choisi. Nous avons pu observé, lorsque nous fermons des vannes pour sélectionner un train, que les gouttes continuent leur écoulement. Ce phé-

Chapitre 4. Inhibition de la croissance bactérienne.

nomène est certainement du fait de la déformation des matériaux qui reprennent leurs dimensions d'origines, lorsqu'ils ne sont plus soumis aux pressions créées par les débits imposés. Le "retour à la normale" fait s'écouler les gouttes dans les capillaires, et certaines sortent du capillaire de mesure. La perte est considérée comme faible (moins de 15%). Nous ne pouvons pas savoir quelles gouttes sont perdues. Si nous produisions notre gradient sur toutes les gouttes du train sélectionné, nous ne pourrions pas conserver la totalité du gradient. Dans ce cas, le problème majeur est que nous ne pourrions pas savoir quelles concentrations nous perdons.

En pratique, nous formons les gouttes de la première à la seconde branche (figure 3.9 p.95). Initialement la concentration en céfotaxime est constante. Nous déclenchons en même temps la dilution et le comptage des gouttes pour la sélection. Puis nous comptabilisons 1500 gouttes. A cet instant nous avons 1500 gouttes de concentration constante en céfotaxime dans la seconde branche et 1500, qui contiennent le gradient, dans la première. C'est le moment où nous arrêtons le flux d'eau pour ne plus former de gouttes. Nous poussons donc les gouttes et vérifions que nous avons composé un gradient, par observation du niveau de fluorescence. Si nous avions eût le gradient sur les 1500 gouttes, nous n'aurions pas eût de marge d'erreur concernant la sélection du train. Alors que de cette façon nous avons environ 500 gouttes d'assurance (à concentration constante) contre les pertes dues aux erreurs possibles de manipulations et à l'inertie du système. C'est le moyen employé pour avoir le gradient voulu dans le train sélectionné. C'est pourquoi le profil se décompose en :

- un petit groupe de gouttes à concentration maximale constante en antibiotique
- un groupe de gouttes composant le gradient en antibiotique
- un petit groupe de gouttes à concentration minimale constante en antibiotique

A l'intérieur de chaque goutte est encapsulé un nombre moyen de bactéries, il est fixé pour chaque expérience. Dans l'exemple présenté (figure 4.1 p.118), l'ino-

4.1. Détermination de la CMI du céfotaxime

culum est de cent bactéries par gouttes. Par définition de la CMI, les bactéries sont capables de se multiplier en cas de sous-dosage en antibiotique (figure 4.3 p.121). Cette figure montre l'évolution de la densité bactérienne en fonction du

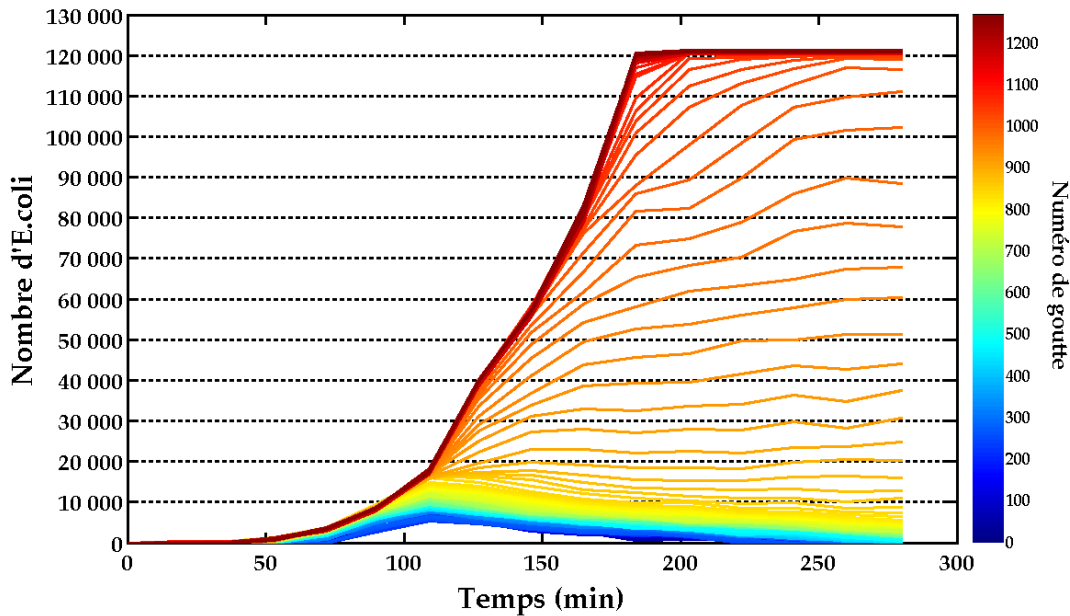


FIGURE 4.3 – Courbes de croissances de 130 échantillons à 37°C, soumis à différentes concentration en antibiotiques. Se référer à la figure 4.2 (p.119) pour la correspondance entre numéro de goutte et concentration en antibiotique.

temps et de la concentration en antibiotique de 10% des échantillons. Nous pouvons observer que la majorité des bactéries ont atteint la phase stationnaire au bout des cinq heures. Nous notons également que la densité finale est dépendante de la concentration en antibiotique. Le profil de l'intensité de toutes les gouttes après cinq heures d'incubation permet d'observer la variation du signal mesuré (figure 4.4 p.122). Cette figure compare, pour chaque goutte, l'intensité après une période d'incubation au signal initial. Tout d'abord, à cause des champs de vitesse à l'intérieur des gouttes, la densité de colloïdes et bactéries est distribuée en continue dans la goutte. Ces particules fluctuent légèrement au niveau du plan focal de détection. Cela produit donc une légère variation de quantité de fluorophore dans le champs de détection selon les gouttes. De ce fait, nous imposons un filtre

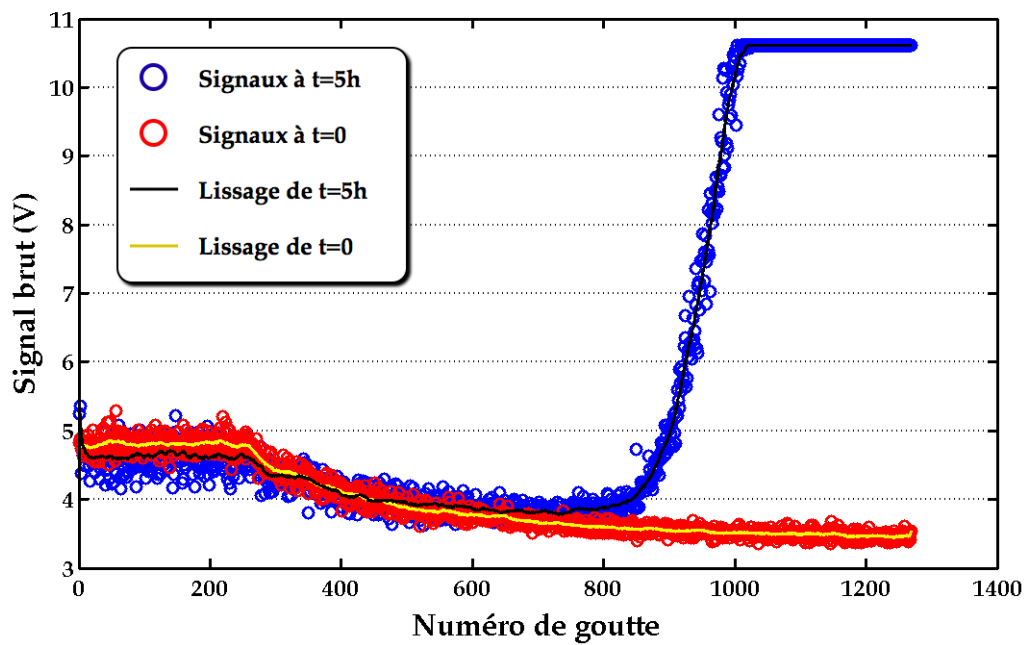


FIGURE 4.4 – Intensités des gouttes à $t=0$ et après cinq heures d’incubation. A chaque période est reportée la courbe de fonction de lissage des signaux bruts propres.

passé-bas sur l’intensité des gouttes par une fonction de lissage. Ceci réduit le bruit intrinsèque à la méthode de mesure, et n’influence pas sur le comportement.

En travaillant donc avec les courbes de lissage, nous observons que les signaux des 700 premières gouttes n’ont pas, ou très peu, évolués. Ceci est dû au fait que ces gouttes sont justement celles qui sont soumises à de fortes concentrations en céfotaxime (figure 4.2 p.119). Nous notons d’ailleurs, que ce sont les gouttes qui ne se sont pas multipliées (figure 4.3 p.121). Cela signifie donc que les concentrations impliquées ici, inhibent la croissance bactérienne. Lorsque la courbe noire de lissage (figure 4.4 p.122) se trouve en dessous de la courbe jaune, nous avons perdu en intensité. Ce phénomène est dû à la décroissance du nombre de molécules fluorescentes dans un état excitable (le photoblanchiment) à cause des nombreux passages devant le détecteur.

Ensuite, de la 700^{ème} à la 1000^{ème} goutte, nous observons une zone de tran-

4.1. Détermination de la CMI du céfotaxime

sition. Dans cette zone, plus la concentration en antibiotique diminue (figure 4.2 p.119) plus la densité cellulaire augmente. Les concentrations impliquées limitent clairement la densité finale en organismes sans avoir inhibé pour autant le développement des organismes. Cet effet a également été observé [71], c'est justement dans cette zone que nous nous distinguons des procédures standards. En effet, les faibles variations de population n'y sont certainement pas détectées, et même si c'est le cas, la faible résolution du gradient d'antibiotique réduit fortement la probabilité de trouver la réelle frontière d'inhibition. Par exemple, dans une expérience simi-

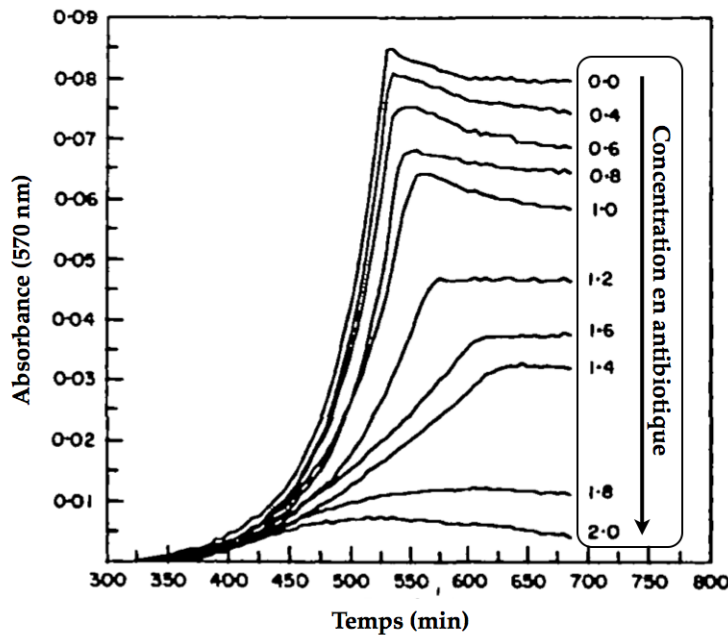


FIGURE 4.5 – Evolution de la densité en organisme en fonction du temps et en fonction de la concentration en antibiotique [71].

laire (figure 4.5 p.123) la résolution en concentration est de l'ordre de $10^{-1} \mu\text{g}/\text{mL}$, dans notre cas elle est de $10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$. De plus l'absorbance minimale détectée est de 0,005, ce qui équivaut à $2 \cdot 10^6$ cellules, ceci est plus de dix fois plus important que les densités cellulaires maximales mesurées dans notre système. Cela implique donc que dans l'exemple cité, s'il avaient testé notre couple biocide/bactérie, notre zone de transition serait passée dans leur zone d'inhibition. Finalement, la zone de

Chapitre 4. Inhibition de la croissance bactérienne.

transition est suivie par la zone de saturation du PMT. Cela signifie que la densité cellulaire présente produit une trop forte intensité lumineuse pour l'amplification du PMT utilise (0,65V). Cela ne perturbe pas les mesures d'inhibition puisque si les bactéries sont en assez grand nombre pour saturer le PMT, cela veut dire que la croissance est avérée.

Ces considérations font état de la frontière entre croissance (même limitée) et inhibition. Nous avons fait l'approximation de cette frontière à la 700^{ème} goutte. Si on se réfère à la figure 4.2 (p.119), nous pouvons d'ores et déjà évaluer la CMI entre 0,01 et 0,015 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De façon plus précise, nous avons identifié les gouttes et

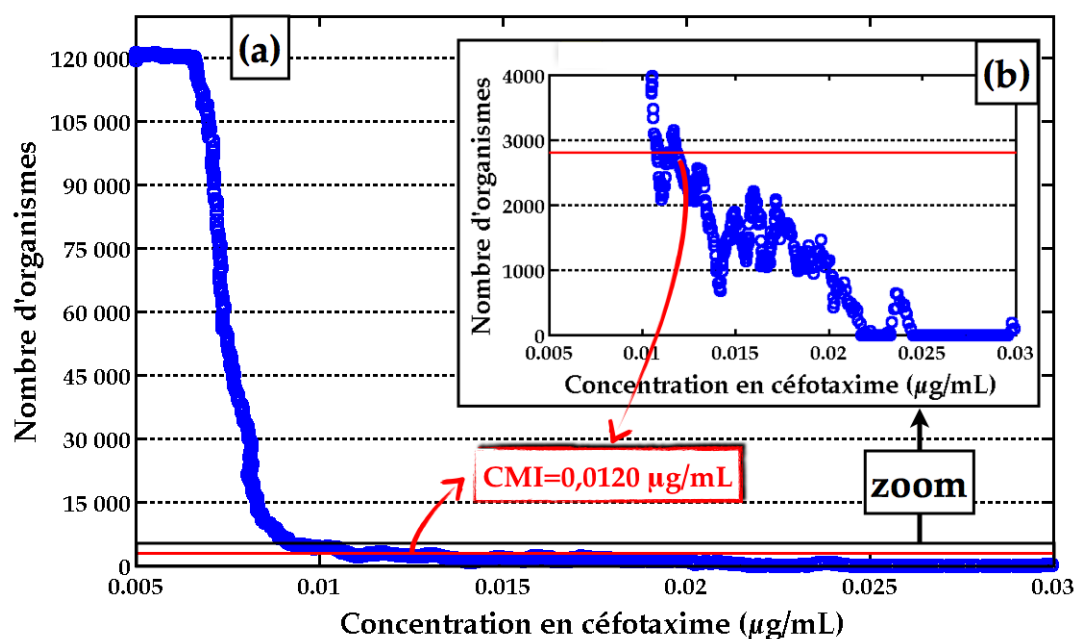


FIGURE 4.6 – (a) : Représentation de la densité finale en organisme dans les échantillons en fonction de leur concentration en antibiotique, pour un inoculum moyen de cent bactéries. (b) : Zoom sur la zone à faible nombre d'organismes pour une meilleure visibilité de la CMI. La ligne rouge est la limite de détection des cellules, N^* , dans notre dispositif.

leur avons attribué leurs signaux ainsi que leurs concentrations en céfotaxime. Nous pouvons donc établir la densité finale en organismes en fonction de la concentration

4.2. Influence de l'inoculum sur la CMI

en antibiotique (figure 4.6 p.124). Cela nous permet de déterminer la CMI par l'estimation de la frontière entre inhibition et croissance.

La figure 4.6.a (p.124) établie la densité bactérienne produite après cinq heures d'incubation en fonction de la concentration en antibiotique correspondante. Cette figure révèle la CMI comme étant la concentration minimale inhibant toute croissance en dessous de la limite de détection (N^*). La valeur est déterminée par la figure 4.6.b (p.124) de manière précise en observant la plus faible concentration de la zone d'inhibition.

Cet exemple est représentatif de l'analyse de données conduisant à la détermination de la CMI d'un inoculum. Nous sommes capable de déterminer la CMI du céfotaxime pour différents inoculums. Il est nécessaire d'ajuster la concentration initiale en céfotaxime qui est diluée par la suite en fonction de l'inoculum. Par exemple pour un inoculum de mille bactéries par gouttes, le gradient variait de 0,1 à 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.2 Influence de l'inoculum sur la CMI

Nous pouvons établir que la colonie bactérienne de taille n_i soumise au temps $t = 0$ à une contrainte C en antibiotique, aura une réponse déterminée dans notre système de mesure. Il s'avère que la colonie de taille n_i pourra atteindre $N \geq N^*$, si la concentration imposée est inférieure ou égale à la CMI. La détermination de la CMI pour tous les inoculums étudiés nous a permis d'établir la figure 4.7 (p.126). Elle nous permet de corroborer la dépendance logarithmique à l'inoculum décrite dans la littérature. En effet, nous pouvons établir la régression linéaire de la CMI, notée C_{mi} , en fonction de $\ln(n_i)$.

$$C_{mi} = C_1 + C_0 \cdot \ln(n_i) \quad (4.1)$$

La courbe tendance nous donne accès aux paramètres de la droite. Tout d'abord C_1 est la concentration pour laquelle $\ln(n_i) = 0$ c'est à dire pour un inoculum

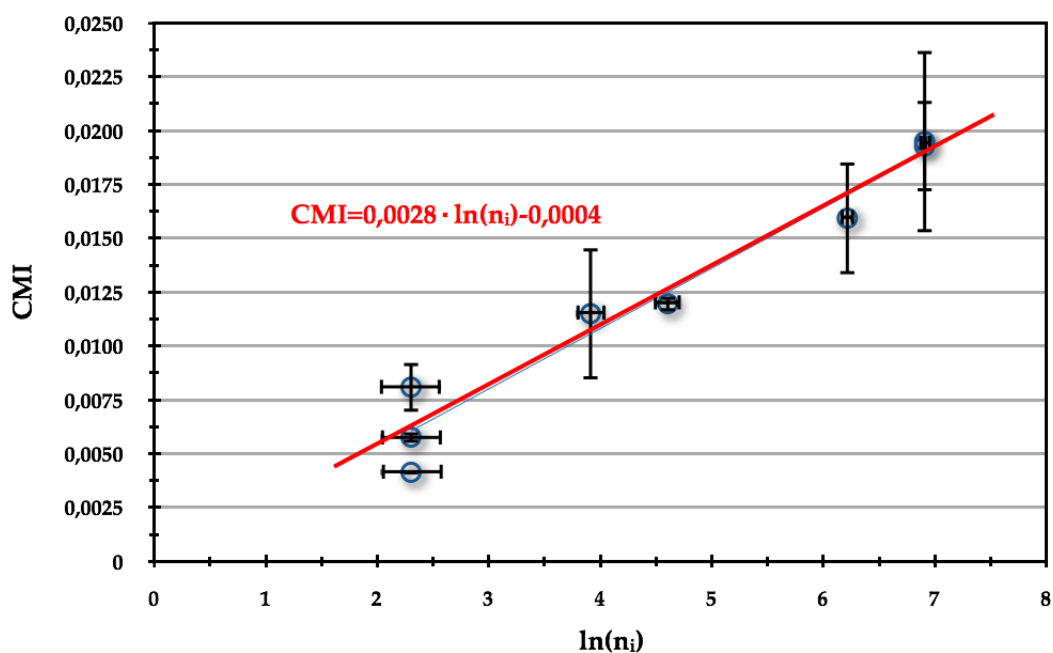


FIGURE 4.7 – CMI de la céfotaxime en fonction de la taille de l'inoculum. Le tracé inséré est en échelle linéaire. Et le graphique étudié en représente la CMI en fonction de $\ln(n_i)$. En rouge est représentée la courbe tendance.

de une bactérie *E.coli*. La courbe tendance donne une valeur négative, ce qui est impossible, mais nous nous apercevons que pour un inoculum de une bactérie, la CMI s'approche de zéro. Nous pouvons même la considérer comme nulle car elle est d'un ordre inférieur à notre limite de détection. Cela veut dire que dès qu'une bactérie est soumise à un stress antibiotique, elle est inhibée. La pente de la droite, C_0 , est définie comme la concentration caractéristique du couple céfotaxime/*E.coli*. C'est la réponse propre au matériel biologique utilisé. On peut considérer que le comportement de la dépendance logarithmique de la CMI à la taille de l'inoculum est vraie pour tout couple. Par contre la pente peut varier. C'est certainement à cause du fait de la faible valeur de la pente que certains auteurs ont considéré au mieux que l'effet de l'inoculum était faible ou pour d'autres nul.

Conclusion

La conception d'un train de gouttes permet de discrétiser les échantillons. De plus, la dilution en continue produit un train de gouttes enregistrant un gradient en antibiotique à haute résolution. La mesure de la CMI est influencée par la limite de détection. En effet, elle est déterminée comme étant la concentration minimale pour laquelle un inoculum n'a pas pu dépasser N^* . Mais notre système possède également une bonne résolution sur la quantité minimale de bactéries détectées. Ainsi, l'encapsulation d'un inoculum moyen en présence d'antibiotique permet de mesurer la CMI de manière très fine. Après répétition des expériences à différents inoculums, nous avons établi la quantification de la dépendance de la CMI en fonction de l'inoculum. La CMI d'un antibiotique est déterminée par la taille de l'inoculum, soumis à un stress antibiotique. Elle dépend également d'une concentration caractéristique, celle du couple antibiotique/bactéries utilisé.

Chapitre 4. Inhibition de la croissance bactérienne.

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous sommes intéressés aux champs d'applications biologiques par l'utilisation de gouttes en tant que mini-éprouvettes. L'échelle de taille des gouttes offre la possibilité d'étudier et manipuler de petites populations de micro-organismes, en comparaison avec les expériences macroscopiques. La géométrie linéaire, employée dans notre cas, permet l'étiquetage des échantillons, et le suivi individuel dans le temps donne accès à la croissance des organismes. L'avantage de ces méthodes réside également dans la capacité à produire un grand nombre de gouttes. Cela permet d'établir une vaste statistique à partir des échantillons. Ce concept est employé pour étudier la variabilité cellulaire. En outre, il est possible d'étudier l'effet de la variation d'une contrainte environnementale. Cela s'effectue par le contrôle de la composition des gouttes, et notamment par la production d'un gradient de composition dans les échantillons. Ceci donnant accès à un criblage fin de la composition interne des gouttes.

Les études statistiques par contrôle de composition sont applicable à de nombreux cas biologiques. Nous avons cherché à caractériser la dépendance entre la taille d'un inoculum et la concentration minimale nécessaire pour inhiber sa croissance. L'investigation de cette problématique a révélée la nécessité de mettre au point un nouvel outil de mesure de la CMI. Nous avons donc utilisé la milli-fluidique digitale, afin de concevoir un outil automatisé alloué aux mesures du stress de micro-organismes.

Nous avons choisi la milli-fluidique, car l'encapsulation de différents inoculums forcent à tester de fortes densité cellulaires, et ainsi de trop grands volumes de

Conclusion générale

gouttes pour la micro-fluidique. Le champ micro-fluidique digitale offre la possibilité de produire des outils complets d'études en microbiologie. C'est en ce sens que nous avons mis au point un outil permettant de réaliser un gradient d'antibiotique dans lequel se développe, ou non, des bactéries dans des gouttes. La manipulation et la mesure de l'activité biologique des échantillons sont automatisées. L'effet de la quantité de bactéries initialement encapsulées, l'inoculum n_i , sur la valeur de la CMI a pu être évalué. Nous observons une dépendance logarithmique avec n_i .

Bibliographie

- [1] A. R. Abate, A. Poitzsch, Y. Hwang, J. Lee, J. Czerwinska, and D. A. Weitz. Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation. *Phys. Rev. E*, 80(2) :026310–, August 2009.
- [2] Adam R. Abate, Chia-Hung Chen, Jeremy J. Agresti, and David A. Weitz. Beating poisson encapsulation statistics using close-packed ordering. *Lab Chip*, 9(18) :2628–2631, 2009.
- [3] Javier Atencia and David J. Beebe. Controlled microfluidic interfaces. *Nature*, 437(7059) :648–655, September 2005.
- [4] Nathalie Q. Balaban, Jack Merrin, Remy Chait, Lukasz Kowalik, and Stanislas Leibler. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690) :1622–1625, 2004.
- [5] Frederick K. Balagadde, Lingchong You, Carl L. Hansen, Frances H. Arnold, and Stephen R. Quake. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 309(5731) :137–140, 2005.
- [6] Jean-Christophe Baret, Valérie Taly, Ryckelynck Michael, Christoph A. Merten, and Andrew D. Griffiths. Gouttes et émulsions : Criblage à très haut débit en biologie. *Medecine sciences*, 25 :627–632, 2009.
- [7] Branka Bedenic, Jasmina Vranes, Natasa Beader, Ines Jajic-Bencic, Vanda Plecko, Selma Uzunovic-Kamberovic, and Smilja Kalenic. Effect of inoculum size of enterobacteriaceae producing shv and ctx-m extended-spectrum β -

BIBLIOGRAPHIE

- lactamases on the susceptibility to β -lactam combinations with inhibitors and carbapenems. *Medicinski Glasnik*, 6 :166 – 172, 2009.
- [8] Paul Benkimoun. Des super-bactéries dans les valises du tourisme médical. *Le Monde*, Août 2010.
- [9] Eva Bidlas, Tingting Du, and Ronald J.W. Lambert. An explanation for the effect of inoculum size on mic and the growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2) :140 – 152, 2008.
- [10] James Q. Boedicker, Liang Li, Timothy R. Kline, and Rustem F. Ismagilov. Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(8) :1265–1272, 2008.
- [11] James Q. Boedicker, Meghan E. Vincent, and Rustem F. Ismagilov. Microfluidic confinement of single cells of bacteria in small volumes initiates high-density behavior of quorum sensing and growth and reveals its variability. *Angewandte Chemie*, 121(32) :6022–6025, 2009.
- [12] Nicolas Bremond, Abdou R. Thiam, and Jérôme Bibette. Decompressing emulsion droplets favors coalescence. *Phys. Rev. Lett.*, 100(2) :024501–, January 2008.
- [13] Alexei Brooun, Songhua Liu, and Kim Lewis. A dose-response study of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(3) :640–646, 2000.
- [14] Eric Brouzes, Martina Medkova, Neal Savenelli, Dave Marran, Mariusz Twardowski, J. Brian Hutchison, Jonathan M. Rothberg, Darren R. Link, Norbert Perrimon, and Michael L. Samuels. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34) :14195–14200, 2009.
- [15] Max Chabert. *Microfluidique de gouttes pour les analyses biologiques*. PhD thesis, Université de Paris VI, 2007.

BIBLIOGRAPHIE

- [16] Max Chabert and Jean-Louis Viovy. Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9) :3191–3196, 2008.
- [17] N. Champagne, R. Vasseur, A. Montourcy, and D. Bartolo. Traffic jams and intermittent flows in microfluidic networks. *Physical Review Letters*, 105, 2010.
- [18] S. Chandrasekhar. Stochastic problems in physics and astronomy. *Rev. Mod. Phys.*, 15(1) :1–, January 1943.
- [19] Chia Hsiang Chen, Yi Lu, Mandy L. Y. Sin, Kathleen E. Mach, Donna D. Zhang, Vincent Gau, Joseph C. Liao, and Pak Kin Wong. Antimicrobial susceptibility testing using high surface-to-volume ratio microchannels. *Analytical Chemistry*, 82(3) :1012–1019, February 2010.
- [20] Delai L. Chen, Liang Li, Sebastian Reyes, David N. Adamson, and Rustem F. Ismagilov. Using three-phase flow of immiscible liquids to prevent coalescence of droplets in microfluidic channels : A criteria to identify the third liquid and validation with protein crystallization. *Langmuir*, 23(4) :2255–2260, February 2007.
- [21] Guozhou Chen, Philip D. Jeffrey, Clay Fuqua, Yigong Shi, and Lingling Chen. Structural basis for antiactivation in bacterial quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(42) :16474–16479, 2007.
- [22] P. Christoflogiannis. Current inoculation methods in mic determination. *Aquaculture*, 196(3-4) :297–302, May 2001.
- [23] G F Christopher and S L Anna. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 40(19) :R319, 2007.
- [24] Jenifer Clausell-Tormos, Andrew D. Griffiths, and Christoph A. Merten. An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries. *Lab Chip*, 10(10) :1302–1307, 2010.

BIBLIOGRAPHIE

- [25] Jenifer Clausell-Tormos, Diana Lieber, Jean-Christophe Baret, Abdeslam El-Harrak, Oliver J. Miller, Lucas Frenz, Joshua Blouwolff, Katherine J. Humphry, Sarah K[^]ster, Honey Duan, Christian Holtze, David A. Weitz, Andrew D. Griffiths, and Christoph A. Merten. Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms. *Chemistry & Biology*, 15(5) :427–437, 2008.
- [26] William A. Craig, Sujata M. Bhavnani, and Paul G. Ambrose. The inoculum effect : Fact or artifact? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50(4) :229 – 230, 2004.
- [27] Richard D’Ari and Guennadi Sezonov. *Les organismes modèles - Biologie et génétique d’Escherichia coli*. Belin Sup, 2008.
- [28] M. De Menech, P. Garstecki, F. Jousse, and H. A. Stone. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic t-shaped junction. *Journal of Fluid Mechanics*, 595(-1) :141–161, 2008.
- [29] Andrew J. deMello. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 442(7101) :394–402, July 2006.
- [30] Stephen P. Diggle, Ashleigh S. Griffin, Genevieve S. Campbell, and Stuart A. West. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450(7168) :411–414, November 2007.
- [31] Remi Dreyfus, Patrick Tabeling, and Herve Willaime. Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels. *Phys. Rev. Lett.*, 90(14) :144505–, April 2003.
- [32] Jon F. Edd, Dino Di Carlo, Katherine J. Humphry, Sarah Koster, Daniel Irimia, David A. Weitz, and Mehmet Toner. Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops. *Lab Chip*, 8(8) :1262–1264, 2008.
- [33] Maria Egervarn, Hans Lindmark, Stefan Roos, Geert Huys, and Sven Lindgren. Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution

- susceptibility testing of lactic acid bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, pages AAC.00637–06, 2006.
- [34] Jamil El-Ali, Peter K. Sorger, and Klavs F. Jensen. Cells on chips. *Nature*, 442(7101) :403–411, July 2006.
- [35] W. Engl, R. Backov, and P. Panizza. Controlled production of emulsions and particles by milli- and microfluidic techniques. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4) :206–216, August 2008.
- [36] W. Engl, M. Tachibana, A. Colin, and P. Panizza. A droplet-based high-throughput tubular platform to extract rate constants of slow chemical reactions. *Chemical Engineering Science*, 63(6) :1692–1695, March 2008.
- [37] Wilfried Engl. *Gestion de gouttes sur un réseau millifluidique, exemples d'analyse haut débit et mise en forme de matériaux*. PhD thesis, Université de Bordeaux I, 2006.
- [38] Aude Ferran, Veronique Dupouy, Pierre-Louis Toutain, and Alain Bousquet-Melou. Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of escherichia coli in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(11) :4163–4166, 2007.
- [39] Piotr Garstecki, Michael J. Fuerstman, Howard A. Stone, and George M. Whitesides. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic t-junction—scaling and mechanism of break-up. *Lab Chip*, 6(3) :437–446, 2006.
- [40] Alicia Gomez-Lopez, Amel Aberkane, Eva Petrikkou, Emilia Mellado, Juan Luis Rodriguez-Tudela, and Manuel Cuenca-Estrella. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of aspergillus spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010.
- [41] Andrew D. Griffiths and Dan S. Tawfik. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends in Biotechnology*, 24(9) :395–402, September 2006.
- [42] Alex Groisman, Caroline Lobo, HoJung Cho, J Kyle Campbell, Yann S Dufour, Ann M Stevens, and Andre Levchenko. A microfluidic chemostat for

BIBLIOGRAPHIE

- experiments with bacterial and yeast cells. *Nat Meth*, 2(9) :685–689, September 2005.
- [43] Pierre Guillot, Armand Ajdari, Julie Goyon, Mathieu Joanicot, and Annie Colin. Droplets and jets in microfluidic devices. *Comptes Rendus Chimie*, 12(1-2) :247–257, January 2009.
- [44] Pierre Guillot and Annie Colin. Stability of parallel flows in a microchannel after a t junction. *Phys. Rev. E*, 72(6) :066301–, December 2005.
- [45] Amit Gupta and Ranganathan Kumar. Effect of geometry on droplet formation in the squeezing regime in a microfluidic t-junction. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8(6) :799–812, 2010.
- [46] Amit Gupta, S. M. Sohel Murshed, and Ranganathan Kumar. Droplet formation and stability of flows in a microfluidic t-junction. *Appl. Phys. Lett.*, 94(16) :164107–3, April 2009.
- [47] Lucas R. Hoffman, David A. D’Argenio, Michael J. MacCoss, Zhaoying Zhang, Roger A. Jones, and Samuel I. Miller. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054) :1171–1175, August 2005.
- [48] C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angile, C. H. J. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K. J. Humphry, R. A. Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano, and D. A. Weitz. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab Chip*, 8(10) :1632–1639, 2008.
- [49] A. Huebner, M. Srisa-Art, D. Holt, C. Abell, F. Hollfelder, A. J. deMello, and J. B. Edel. Quantitative detection of protein expression in single cells using droplet microfluidics. *Chemical Communications*, 12(12) :1218–1220, 2007.
- [50] Ansgar Huebner, Sanjiv Sharma, Monpichar Srisa-Art, Florian Hollfelder, Joshua Edel, and Andrew deMello. Microdroplets : A sea of applications? *Lab Chip*, 8(8) :1244–1254, 2008.

- [51] Hansjorg Hufnagel, Ansgar Huebner, Carina Gulch, Katharina Guse, Chris Abell, and Florian Hollfelder. An integrated cell culture lab on a chip : modular microdevices for cultivation of mammalian cells and delivery into microfluidic microdroplets. *Lab Chip*, 9(11) :1576–1582, 2009.
- [52] Mathieu Joanicot and Armand Ajdari. Droplet control for microfluidics. *Science*, 309(5736) :887–888, 2005.
- [53] Saif A. Khan and Suhanya Duraiswamy. Microfluidic emulsions with dynamic compound drops. *Lab Chip*, 9(13) :1840–1842, 2009.
- [54] T. R. R. Kievit, Teresa de Kievit and Barbara H. Iglewski. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.*, 68(9) :4839–4849, 2000.
- [55] Haejune Kim, Dawei Luo, Darren Link, David A. Weitz, Manuel Marquez, and Zhengdong Cheng. Controlled production of emulsion drops using an electric field in a flow-focusing microfluidic device. *Appl. Phys. Lett.*, 91(13) :133106–3, September 2007.
- [56] Balint Kintses, Liisa D van Vliet, Sean RA Devenish, and Florian Hollfelder. Microfluidic droplets : new integrated workflows for biological experiments. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(5) :548–555, October 2010.
- [57] A.L. Koch. Bacterial choices for the consumption of multiple resources for current and future needs. *Microbial Ecology*, 49(2) :183–197, 2005-02-01.
- [58] Sarah Koster, Francesco E. Angile, Honey Duan, Jeremy J. Agresti, Anton Wintner, Christian Schmitz, Amy C. Rowat, Christoph A. Merten, Dario Pisignano, Andrew D. Griffiths, and David A. Weitz. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab Chip*, 8(7) :1110–1115, 2008.
- [59] Jan-Ulrich Kreft. Biofilms promote altruism. *Microbiology*, 150(8) :2751–2760, 2004.
- [60] Jason E. Kreutz, Anton Shukhaev, Wenbin Du, Sasha Druskin, Olafs Daugulis, and Rustem F. Ismagilov. Evolution of catalysts directed by genetic algorithms in a plug-based microfluidic device tested with oxidation of methane

BIBLIOGRAPHIE

- by oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 132(9) :3128–3132, March 2010.
- [61] Karthikeyan K Kumarasamy, Mark A Toleman, Timothy R Walsh, Jay Bagaria, Fafhana Butt, Ravikumar Balakrishnan, Uma Chaudhary, Michel Doumith, Christian G Giske, Seema Irfan, Padma Krishnan, Anil V Kumar, Sunil Maharjan, Shazad Mushtaq, Tabassum Noorie, David L Paterson, Andrew Pearson, Claire Perry, Rachel Pike, Bhargavi Rao, Ujjwayini Ray, Jayanta B Sarma, Madhu Sharma, Elizabeth Sheridan, Mandayam A Thirunarayan, Jane Turton, Supriya Upadhyay, Marina Warner, William Welfare, David M Livermore, and Neil Woodford. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in india, pakistan, and the uk : a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, In Press, Corrected Proof, 2010.
- [62] Edo Kussell, Roy Kishony, Nathalie Q. Balaban, and Stanislas Leibler. Bacterial persistence : A model of survival in changing environments. *Genetics*, 169(4) :1807–1814, 2005.
- [63] R.J.W. Lambert. Susceptibility testing : inoculum size dependency of inhibition using the colworth mic technique. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2) :275–279, 2000.
- [64] R.J.W. Lambert and J. Pearson. Susceptibility testing : accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (mic) and non-inhibitory concentration (nic) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5) :784–790, 2000.
- [65] Cornelia Lass-Flörl, Speth, Kofler, Dierch, Gunsilius, and Würzner. Effect of increasing inoculum sizes of aspergillus hyphae on mics and mfc's of antifungal agents by broth microdilution method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(3) :229 – 233, 2003.
- [66] Henry H. Lee, Michael N. Molla, Charles R. Cantor, and James J. Collins. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 467(7311) :82–85, September 2010.

BIBLIOGRAPHIE

- [67] Joung-Hyun Lee, Jeffrey Kaplan, and Woo Lee. Microfluidic devices for studying growth and detachment of staphylococcus epidermidis biofilms. *Biomedical Microdevices*, 10(4) :489–498, August 2008.
- [68] Kim Lewis. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(4) :999–1007, 2001.
- [69] Kim Lewis. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Micro*, 5(1) :48–56, January 2007.
- [70] Mary E. Lidstrom and Deirdre R. Meldrum. Life-on-a-chip. *Nat Rev Micro*, 1(2) :158–164, November 2003.
- [71] J. R. Lobry, G. Carret, and J. P. Flandrois. Maintenance requirements of escherichia coli atcc 25922 in the presence of sub-inhibitory concentrations of various antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(2) :121–127, 1992.
- [72] Hans-Peter Meyer, Othmar Kappeli, and Armin Fiechter. Growth control in microbial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 39 :299–319, 1985.
- [73] J Monod. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1) :371–394, 1949.
- [74] Rajendrani Mukhopadhyay. When pdms isn't the best. *Analytical Chemistry*, 79(9) :3248–3253, May 2007.
- [75] A Novick. Growth of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 9(1) :97–110, 1955.
- [76] OMS. Résistance aux antimicrobiens. *Aide-mémoire*, 194, 2002.
- [77] L. Prescott, J. Harley, and D. Klein. *Microbiologie. de boeck*, 2nd edition, 2007.
- [78] Anne Marie Queenan, Barbara Foleno, Colleen Gownley, Ellyn Wira, and Karen Bush. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in ampc- and extended-spectrum beta-lactamase (esbl)-producing escherichia coli and klebsiella pneumoniae clinical isolates tested by using nccls esbl methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 42(1) :269–275, 2004.

BIBLIOGRAPHIE

- [79] Richard Quintiliani.
- [80] Roland R. Regoes, Camilla Wiuff, Renata M. Zappala, Kim N. Garner, Fernando Baquero, and Bruce R. Levin. Pharmacodynamic functions : a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(10) :3670–3676, 2004.
- [81] Yves Romeo, Jean Bouvier, and Claude Gutierrez. La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques lactococcus lactis et lactobacillus plantarum. *Lait*, 81(1-2) :49–55, 2001.
- [82] C. H. Schmitz, A. C. Rowat, S. Köster, and D. A. Weitz. Dropspots : a picoliter array in a microfluidic device. *Lab On A Chip*, 9, 2009.
- [83] Guennadi Sezonov, Daniele Joseleau-Petit, and Richard D’Ari. Escherichia coli physiology in luria-bertani broth. *J. Bacteriol.*, 189(23) :8746–8749, 2007.
- [84] Weiwei Shi, Jianhua Qin, Nannan Ye, and Bingcheng Lin. Droplet-based microfluidic system for individual caenorhabditis elegans assay. *Lab Chip*, 8(9) :1432–1435, 2008.
- [85] Jung-uk Shim, Luis F. Olguin, Graeme Whyte, Duncan Scott, Ann Babbie, Chris Abell, Wilhelm T. S. Huck, and Florian Hollfelder. Simultaneous determination of gene expression and enzymatic activity in individual bacterial cells in microdroplet compartments. *Journal of the American Chemical Society*, 131(42) :15251–15256, October 2009.
- [86] Lingling Shui, Jan C.T. Eijkel, and Albert van den Berg. Multiphase flow in microfluidic systems - control and applications of droplets and interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 133(1) :35–49, May 2007.
- [87] H. Song, D. L. Chen, and R. F. Ismagilov. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(44) :7336–7356, 2006.
- [88] H. Song, J. D. Tice, and R. F. Ismagilov. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie*, 115(7) :792–796, 2003.

BIBLIOGRAPHIE

- [89] H. Steels, S. A. James, I. N. Roberts, and M. Stratford. Sorbic acid resistance : the inoculum effect. *Yeast*, 16(13) :1173–1183, 2000.
- [90] Philip S Stewart and J William Costerton. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276) :135 – 138, 2001.
- [91] H.A. Stone, A.D. Stroock, and A. Ajdari. Engineering flows in small devices. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 36(1) :381–411, January 2004.
- [92] Patrick Tabeling. *Introduction à la microfluidique*. Belin, 2003.
- [93] Vincent H. Tam, Kimberly R. Ledesma, Kai-Tai Chang, Tsai-Ying Wang, and John P. Quinn. Killing of escherichia coli by [beta]-lactams at different inocula. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(2) :166 – 171, 2009.
- [94] Abdou R. Thiam, Nicolas Bremond, and Jerome Bibette. Breaking of an emulsion under an ac electric field. *Phys. Rev. Lett.*, 102(18), May 2009.
- [95] Kenneth S. Thomson and Ellen Smith Moland. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(12) :3548–3554, 2001.
- [96] Todd Thorsen, Sebastian J. Maerkl, and Stephen R. Quake. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 298(5593) :580–584, 2002.
- [97] Joshua D. Tice, Adam D. Lyon, and Rustem F. Ismagilov. Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels. *Analytica Chimica Acta*, 507(1) :73–77, April 2004.
- [98] M. W. Toepke and D. J. Beebe. Pdms absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab On A Chip*, 6(12) :1484–1486, December 2006.
- [99] Klas I. Udekwu, Nicholas Parrish, Peter Ankomah, Fernando Baquero, and Bruce R. Levin. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(4) :745–757, 2009.

BIBLIOGRAPHIE

- [100] Paul Vigneaux. *Méthodes level set pour des problèmes d'interface en microfluidique*. PhD thesis, Université de Bordeaux I, 2007.
- [101] Bennett Vogelman and William A. Craig. Kinetics of antimicrobial activity. *J Pediatr*, 108(5) :835–840, 1986.
- [102] C. M. Waters and B. L. Bassler. Quorum sensing : Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21 :319–346, 2005.
- [103] Website. <http://muhammadcank.wordpress.com/2010/03/19/ujimicminimum-inhibitory-concentration/>.
- [104] Website. <http://tpegrp13.e-monsite.com>.
- [105] Website. <http://www.microbe-edu.org>.
- [106] Website. <http://www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html>.
- [107] Website. <http://www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html>.
- [108] Website. <http://www.uniklinik-ulm.de/>.
- [109] Douglas B. Weibel, Willow R. DiLuzio, and George M. Whitesides. Micro-fabrication meets microbiology. *Nat Rev Micro*, 5(3) :209–218, March 2007.