

Table des matières

Introduction.....	1
--------------------------	----------

I. Structures optiques pour le piégeage de bactéries.....	3
--	----------

A) Forces optiques	4
A. 1. Illustration des différents régimes de diffusion	4
A. 2. Dimensions des objets manipulés par forces optiques.....	5
A. 3. Modélisation des forces optiques	6
A. 3. a. Approximation de Rayleigh	12
A. 3. b. Approximation de l'optique géométrique	13
A. 3. c. Conclusion.....	15
B) Exploitations des forces optiques	12
B. 1. Pièges optiques	12
B. 1. a. Pinces optiques.....	12
B. 1. b. Optique intégrée.....	13
B. 1. c. Conclusion	15
B. 2. Manipulation d'objets inertes	15
B. 3. Manipulation d'objets biologiques	17
B. 4. Intérêts et limites.....	18
C) Cristaux photoniques 1D (cavités CMT) et 2D (cavités creuses)	19
C. 1. Description générale.....	19
C. 2. Les cristaux photoniques 1D – cavités CMTN.....	20
C. 3. Les cristaux photoniques 2D – cavités creuses.....	21
C. 4. Caractérisation des structures optiques de piégeage	22
D) Conclusion et enjeux.....	23

II. Dispositif expérimental.....	29
---	-----------

A) Design de microcavités	30
A. 1. Optimisation de la géométrie des cristaux photoniques 1D.....	30
A. 1. a. Indice effectif de la structure.....	30
A. 1. b. Paramètres de calcul	31
A. 1. c. Design de microcavités.....	32
A. 2. Cartographie de champ.....	33
A. 2. a. Cartographie 2D	30
A. 2. b. Cartographie 3D	31

A. 3. Conclusion	36
B) Fabrication.....	37
B. 1. Cristaux photoniques 1D.....	37
B. 2. Cristaux photoniques 2D.....	37
B. 3. Conclusion	38
C) Microfluidique.....	39
D) Montage	40
D. 1. Montage préexistant.....	40
D. 2. Montage développé.....	41
D. 2. a. Système de visualisation.....	41
D. 2. b. Porte échantillon régulé en température	42
D. 2. c. Optimisation des conditions de couplage	43
D. 2. d. Dispositif à deux lasers	43
D. 2. e. Montage expérimental final	44
E) Conclusion.....	45
III. Méthodes d'analyse et caractérisation des structures optiques	47
A) Caractérisation spatiale	48
A. 1. État colloïdal et mouvement brownien	48
A. 1. a. Sédimentation	48
A. 1. b. Agitation thermique	49
A. 2. Protocole expérimental.....	50
A. 3. Analyse des trajectoires.....	50
A. 4. Conclusion	50
B) Caractérisation temporelle	51
B. 1. Concepts généraux.....	51
B. 1. a. Protocole expérimental.....	51
B. 1. b. Signaux transmis par les structures optiques	52
B. 1. c. Analyse des signaux optiques	54
B. 1. d. Conclusion.....	55
B. 2. Caractérisation expérimentale des résonateurs optiques	55
B. 2. a. Indice optique	56
B. 2. b. Température	60
C) Conclusion.....	62
IV. Microbiologie et bactéries	65
A) Propriétés morphologiques	66
A. 1. Forme	66

A. 2. Mobilité	67
A. 3. Membrane	67
B) Culture et Préparation	69
B. 1. Milieu de culture.....	69
B. 2. Conditions et temps de culture.....	69
B. 3. Comptage de bactéries	71
B. 4. Conclusion	71
C) Propriétés optiques	72
C. 1. Cellule bactérienne.....	72
C. 1. a. Méthodes.....	72
C. 1. b. Valeurs d'indice	72
C. 2. Membrane bactérienne	73
C. 3. Conclusion	74
D) Bactéries étudiées	75
D. 1. Description générale	75
D. 2. Préparation des échantillons	76
D. 3. Caractérisation en Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	76
E) Agents antibactériens	78
E. 1. Agents physiques	78
E. 1. a. Filtration.....	78
E. 1. b. Rayonnement ionisant	79
E. 1. c. Température	79
E. 2. Agents chimiques.....	79
E. 2. a. Savons et détergents.....	79
E. 2. b. Oxydants	79
E. 2. c. Antibiotiques	79
F) Diagnostic bactérien	80
F. 1. Identification	80
F. 2. Susceptibilité aux antibiotiques	81
F. 3. Conclusion.....	81
G) Conclusion	82

V. Identification de bactéries piégées 87

A) Étude comportementale et identification	88
A. 1. Caractérisation spatiale.....	88
A. 1. a. Description générale	88
A. 1. b. Paramètres de confinement	90

A. 2. Caractérisation temporelle.....	91
A. 2. a. Description générale	91
A. 2. b. Fonction histogramme	92
A. 3. Conclusion.....	96
B) Identification du type membranaire – Type de Gram	96
B. 1. Description générale	96
B. 2. Discrimination du type de Gram	97
B. 3. Conclusion	100
C) Conclusion.....	101
 VI. Sensibilité des bactéries à un agent antibactérien	 103
 A) Influence de la température	 104
A. 1. Généralités	104
A. 2. Méthode d'analyse de microbiologie.....	104
A. 3. Méthode d'analyse optique.....	108
A. 4. Conclusion.....	117
B) Conclusion.....	118
 Conclusion générale	 121
 Communications.....	 123
 Annexe 1	 125
Annexe 2	127
Annexe 3	131
Annexe 4	133

Table des Figures

I.1. Illustration des différents régimes de diffusion de la lumière	4
I.2. Illustration expérimentale du phénomène de diffusion.....	5
I.3. Principaux objets étudiés par piégeage optique.....	6
I.4. Principe de fonctionnement des forces optiques de gradient	10
I.5. Illustration de la voile solaire – propulsion par pression de radiation	10
I.6. Forces optiques : pression de radiation et force de gradient.....	11
I.7. Principe de fonctionnement de la pince optique.....	13
I.8. Piégeage sur guide d'onde	13
I.9. Images MEB d'anneaux résonants	14
I.10. Cristaux photoniques 1D et 2D.....	14
I.11. Piégeage d'objets inertes en champ proche et lointain.....	15
I.12. Assemblage de particules sur cristaux photoniques 2D.....	16
I.13. Application des pièges optiques.....	16
I.14. Piégeage optique d'objets biologiques	17
I.15. Nano-outils manipulés par piégeage optique pour l'analyse d'objets biologiques	18
I.16. Images MEB de cristaux photoniques 1D et 2D.....	20
I.17. Description des propriétés des cristaux photoniques 1D du laboratoire SiNaPS (CEA)	20
I.18. Description des propriétés des cristaux photoniques 2D du laboratoire RH (EPFL)	21
I.19. Caractéristiques des cristaux photoniques 1D (SiNaPS) et 2D (RH)	22
II.1. Modélisation 2D d'une cavité CMT3.....	30
II.2. Détermination de l'indice effectif d'une cavité CMT3 en modélisation 2D	31
II.3. Paramètres optimaux pour le calcul FDTD	32
II.4. Paramètres géométriques d'une structure CMT _N	32
II.5. Dépendance de la longueur d'onde de résonance d'une cavité CMT3 à sa géométrie	33
II.6. Cartographie de champ d'une cavité CMT3 (modélisation 2D)	34
II.7. Modélisation 3D d'une structure CMT3.....	35
II.8. Cartographe de champ d'une cavité CMT3 (modélisation 3D)	36
II.9. Fabrication des cristaux photoniques 1D à cavité CMT	37
II.10. Fabrication des cristaux photoniques 2D à cavité creuse.....	38
II.11. Puce optofluidique – système de microfluidique statique.....	39
II.12. Montage expérimental préexistant.....	40
II.13. Module de visualisation en fluorescence.....	42
II.14. Porte échantillon avec module Peltier	42
II.15. Deux configurations du dispositif de piégeage (un ou deux lasers)	44
II.16. Montage expérimental développé	44
III.1. Forces s'exerçant sur une bille en suspension colloïdale.....	48
III.2. Trajectoire de bactéries non-piégées pendant 50 secondes.....	50
III.3. Analyse spatiale - paramètres de confinement.....	51
III.4. Signaux optiques transmis par les cristaux photoniques 1D et 2D.....	52

III.5. Signaux de piégeage transmis par les cristaux photoniques 1D et 2D	53
III.6. Analyse des signaux – fonction histogramme	54
III.7. Figures de résonance expérimentales pour les cristaux photoniques 1D et 2D	55
III.8. Influence de l'indice du milieu sur le $\Delta\lambda$ d'une cavité CMT3	56
III.9. Influence de l'indice du milieu sur la résonance d'une cavité CMT3.....	57
III.10. Modélisation 3D d'une bactérie piégée sur cavité CMT3.....	58
III.11. Interaction bactérie-champ évanescent	59
III.12. Abaque reliant $\Delta\lambda$, l'indice et l'altitude d'une bactérie piégée	60
III.13. Influence de la température sur la résonance de cristaux photoniques 1D et 2D	60
III.14. Influence de la puissance laser injectée sur la résonance d'une cavité CMT3.....	61
IV.1. Forme des bactéries	66
IV.2. Différents types de flagelle.....	67
IV.3. Exemple de résultats de tests de Gram.....	68
IV.4. Structures membranaires des bactéries à Gram négatif et positif.....	68
IV.5. Milieux de culture (gélose et liquide).....	69
IV.6. Courbes de croissance bactérienne.....	70
IV.7. Méthode de comptage sur boîte de Pétri.....	71
IV.8. Mesure d'indice optique par réfractométrie immersive.....	72
IV.9. Indices moyens de bactéries	73
IV.10. Indice membranaire de bactéries à Gram positif.....	74
IV.11. Bactéries étudiées, lien phylogénétique et propriétés	75
IV.12. Images MEB sans métallisation des sept bactéries étudiées.....	77
IV.13. Images MEB avec dépôt d'or après évaporation des bactéries	77
IV.14. Images MEB avec substrat métallisé (or) avant évaporation de bactéries	78
IV.15. Gestion bactériologique d'un prélèvement standard	80
IV.16. Antibiotogrammes.....	81
V.1. Dispositif de piégeage pour l'identification de propriétés bactériennes (morphologie et mobilité)	88
V.2. Mouvement brownien de bactéries piégées et non-piégées	89
V.3. Analyse numérique du comportement spatial des bactéries	90
V.4. Exemples de trajectoires de <i>S. epidermidis</i>	90
V.5. Signal de piégeage d'une bactérie <i>E. coli</i>	91
V.6. Signaux de piégeage des bactéries <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>B. subtilis</i>	92
V.7. Fonction histogramme du signal de piégeage d' <i>E. coli</i> sur 50 secondes.....	93
V.8. Analyse des signaux de piégeage par le calcul de la fonction histogramme.....	93
V.9. Temps de piégeage pertinent pour le calcul de la fonction histogramme.....	94
V.10. Reproductibilité des mesures de ΔL des fonctions histogrammes	95
V.11. Dispositif de piégeage pour l'identification de propriétés membranaires de bactéries.....	96
V.12. Signaux de piégeage sur cristaux photoniques 2D à cavités creuses	97
V.13. Analyse des signaux de piégeage par type de bactérie (ΔT_{rel})	98
V.14. Décalage de la longueur d'onde de résonance de la cavité creuse lors du piégeage	99
V.15. Identification du type de Gram des bactéries piégées	99
V.16. Fonction histogramme moyenne des sept bactéries étudiées.....	100

VI.1. Températures clés pour la bactérie <i>E. coli</i>	104
VI.2. Cultivabilité de bactéries soumises à un stress thermique (protocole).....	105
VI.3. Proportion de bactéries cultivables dans l'échantillon	105
VI.4. Effet de la température sur la cultivabilité de la bactérie <i>E. coli</i>	106
VI.5. Décroissance du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon	107
VI.6. Dispositif de piégeage – configuration à deux lasers.....	108
VI.7. Influence de la température sur la bactérie <i>E. coli</i> par méthode optique (protocole).....	109
VI.8. Interaction membrane bactérienne-champ évanescent	110
VI.9. Comparaison des méthodes d'optique et de microbiologie	111
VI.10. Images MEB de bactéries exposées à un stress thermique (70°C, 30 minutes).....	112
VI.11. Résultats de la méthode optique.....	113
VI.12. Evaluation de la pertinence de la méthode optique.....	114
VI.13. Variabilité des résultats liés à un biais de mesure.....	116
VI.14. Variabilité des résultats – exemple à 51°C.....	117

Introduction

La manipulation d'objets de tailles nano et micrométrique s'est développée depuis une vingtaine d'années, notamment à travers l'utilisation des forces optiques. Ces dernières se divisent principalement en deux composantes : la pression de radiation et la force optique de gradient. Elles caractérisent l'effet mécanique que peut avoir la lumière sur des particules de matière. Cette interaction lumière-matière prend principalement la forme d'une propulsion ou d'une attraction. Mais pour créer de telles forces, il faut modeler la lumière de manière à créer des conditions favorables de concentration de puissance et de gradient de champ électromagnétique. Le premier dispositif qui a vu le jour est la pince optique qui repose sur la focalisation d'un faisceau laser. *A. Ashkin* est l'un des premiers à avoir démontré qu'il était possible de piéger des particules colloïdales avec ce type de dispositif en 1986. L'année suivante, il montrait également que les pinces optiques autorisent également le piégeage d'objets biologiques de type bactéries et virus.

Dans un souci d'intégration et dans la mouvance du « Lab-on-a-chip », des structures optiques ont été fabriquées sur puce pour recréer ces forces optiques. Des guides d'onde, des cristaux photoniques, des anneaux résonants et bien d'autres types de structures ont ainsi été développés et ont fait leurs preuves en matière de piégeage et de manipulation d'objets inertes et biologiques de taille nano et micrométrique. Ces structures optiques intégrées présentent plusieurs avantages : elles opèrent sans contact, à faible puissance et leur effet est réversible. Ces propriétés permettent de préserver les objets manipulés, notamment dans le cas des objets biologiques. Souvent couplées à des systèmes de microfluidique complexes, à des fonctionnalisations de surface ou à d'autres méthodes d'analyse (Raman) elles permettent à la fois de piéger et d'analyser les objets de manière extrêmement rapide. Elles permettent également une manipulation et une caractérisation d'un objet unique, donnant accès à des mesures d'une grande précision et à des données de dispersion à l'intérieur d'une population. Cette dernière caractéristique est particulièrement intéressante en microbiologie et en biologie de manière plus générale, où les méthodes de caractérisation traditionnelles ne permettent généralement que d'étudier un grand nombre d'objets (virus, bactéries, cellules) et d'obtenir une information moyenne sur un échantillon. Ces objets microbiologiques de type virus, bactéries et cellules sont très largement étudiés par les dispositifs à forces optiques. Ils présentent des caractéristiques de taille et d'indice optique particulièrement adaptées.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit. Ils sont le fruit d'une collaboration entre trois laboratoires du bassin grenoblois : l'équipe micro-nanotechnologie pour la santé du laboratoire LTM (Laboratoire des Technologies de la Microélectronique) du CNRS, le Laboratoire SiNaPS (Silicium, Nanoélectronique, Photonique et Structures) de l'INAC (Institut Nanosciences et Cryogénie) du CEA et un laboratoire du DTBS (Département Microtechnologies pour la Biologie et la Santé du LETI) du CEA également. Une collaboration s'est également créée et développée durant cette thèse avec le laboratoire RH de l'Institut de Physique de l'EPFL (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne) en Suisse.

Ce travail explore l'utilisation de cristaux photoniques 1D et 2D pour piéger, manipuler et analyser des bactéries. Dans ces travaux, nous avons choisi d'adresser la problématique du diagnostic bactérien. C'est un sujet extrêmement sensible depuis quelques années, avec l'augmentation du phénomène de résistance des bactéries aux antibiotiques. Il est prédit qu'en 2050, les infections bactériennes seront à nouveau la première cause de mortalité dans les pays développés. La lutte contre un tel phénomène se fait notamment au travers

de l'élaboration de nouvelles méthodes de diagnostic plus rapides et plus accessibles afin de limiter la distribution d'antibiotiques abusive qui entraîne ce phénomène de résistance. Nous tenterons de montrer dans ce manuscrit que l'utilisation des pièges optiques sur cristaux photoniques peut adresser cette problématique. Nous y démontrons le piégeage de sept types de bactéries et leur analyse au moyen d'un dispositif adapté à cette thématique et optimisé pour une caractérisation spatiale et temporelle du piégeage de ces bactéries. Une première méthodologie permettant l'identification de propriétés morphologiques et membranaires de bactéries sur piège optique est développée. Nous proposons ensuite une seconde méthode optique permettant d'étudier la susceptibilité des bactéries à un agent antibactérien : la température. Ces résultats sont corrélés à ceux d'une technique classique de microbiologie permettant d'étudier l'influence de la température sur la cultivabilité des bactéries. Ce manuscrit sera divisé en 6 chapitres :

Le premier chapitre est une introduction aux forces optiques et à leur exploitation au travers des dispositifs de piégeage optiques. Un aperçu des objets manipulés et des applications qui existent aujourd'hui est également donné. Nous y présentons ensuite les structures optiques de piégeage que nous utilisons : les microcavités linéiques et les cristaux photoniques 2D à cavités creuses.

Le second chapitre décrit la manière dont ces structures optiques sont conçues et fabriquées. Le système microfluidique que nous utilisons pour amener les bactéries à proximité des cristaux photoniques est également décrit. Enfin, l'ensemble du dispositif expérimental que nous avons développé au cours de ce projet est présenté. Nous décrivons l'ensemble des modifications que nous avons apporté à ce dispositif pour l'adapter du piégeage de billes de polystyrène au piégeage et à l'analyse de bactéries.

Le troisième chapitre rassemble la caractérisation des structures optiques, des bactéries piégées et de leurs interactions. Elle repose sur une méthode d'analyse spatiale caractérisant le comportement et les trajectoires des bactéries piégées et sur une méthode d'analyse temporelle permettant l'étude fine des interactions lumière-matière au sein des structures optiques de piégeage.

Le quatrième chapitre détaille l'ensemble des connaissances de microbiologie nécessaires à la compréhension de ce manuscrit. Les principales propriétés des bactéries (taille, forme, mobilité, propriétés optiques) y sont décrites ainsi que leurs méthodes de culture. Les bactéries que nous avons utilisées au cours de ce projet y sont présentées avec plus de précision. Les principaux agents antibactériens ainsi que les méthodes traditionnelles de diagnostic bactérien sont également décrits dans ce chapitre.

Le cinquième chapitre permet d'adresser la première partie du diagnostic bactérien : l'identification de bactéries. Nous y montrons comment le piégeage de bactéries sur cristaux photoniques (1D et 2D) permet, au travers d'une caractérisation spatiale et temporelle, d'identifier certaines propriétés des bactéries telles que leur morphologie, leur mobilité ou leur structure membranaire (type de Gram).

Le sixième et dernier chapitre s'inscrit dans la seconde partie du diagnostic bactérien : la susceptibilité des bactéries à des agents antibactériens. Nous y présentons l'analyse de l'effet d'un stress thermique sur la bactérie *E. coli*. Pour cette étude, nous avons développé un système de piégeage à deux lasers qui permet de mesurer en temps réel le décalage de la longueur d'onde de résonance des cristaux photoniques lors du piégeage des bactéries. L'étude de la longueur d'onde d'un cristal photonique 1D permet de mesurer l'évolution de l'indice optique des bactéries piégées, donnant accès à un continuum d'états entre une bactérie saine et une bactérie altérée par son exposition à de hautes températures (45°C – 70°C).

I. Structures optiques pour le piégeage de bactéries

A) Forces optiques

- A. 1. Illustration des différents régimes de diffusion
- A. 2. Dimensions des objets manipulés par forces optiques
- A. 3. Modélisation des forces optiques
 - A. 3. a. Approximation de Rayleigh
 - A. 3. b. Approximation de l'optique géométrique
 - A. 3. c. Conclusion

B) Exploitations des forces optiques

- B. 1. Pièges optiques
 - B. 1. a. Pincettes optiques
 - B. 1. b. Optique intégrée
 - B. 1. c. Conclusion
- B. 2. Manipulation d'objets inertes
- B. 3. Manipulation d'objets biologiques
- B. 4. Intérêts et limites

C) Cristaux photoniques 1D (cavités CMT) et 2D (cavités creuses)

- C. 1. Description générale
- C. 2. Les cristaux photoniques 1D – cavités CMT_N
- C. 3. Les cristaux photoniques 2D – cavités creuses
- C. 4. Caractérisation des structures optiques de piégeage

D) Conclusion et enjeux

Les forces optiques, au travers de la force de gradient et de la pression de radiation, permettent le piégeage d'objets de tailles nano et micrométriques. Elles sont exploitées au sein de dispositifs de type pince optique en champ lointain et de type optique intégrée en champ proche. Ce premier chapitre présente le piégeage d'objets inertes et vivants par des dispositifs de piégeage par forces optiques. Le principe physique d'action de ces forces est également détaillé dans différentes approximations. Un état de l'art des dispositifs de piégeage et de leurs applications est également proposé. Les intérêts et les limites de ces dispositifs sont discutés avant la présentation des structures optiques de piégeage utilisées au cours de cette thèse et des motivations du choix de ces structures.

A) Forces optiques

Les phénomènes d'interaction lumière-matière sont intimement liés au phénomène de diffusion de la lumière. Lorsqu'une onde électromagnétique plane est diffusée par une particule sphérique on distingue trois régimes :

- ✎ La diffusion de Rayleigh intervient lorsque la longueur d'onde du faisceau incident est grande devant les dimensions caractéristiques de l'objet. Cette diffusion s'exprime en $1/\lambda^4$, elle est donc très sensible à la longueur d'onde du faisceau incident sur l'objet.
- ✎ Lorsque la longueur d'onde du faisceau incident est faible devant les dimensions de l'objet éclairé, les phénomènes ondulatoires sont négligés et c'est l'optique géométrique qui permet d'expliquer les phénomènes observés.
- ✎ La diffusion de Mie intervient lorsque la longueur d'onde du faisceau incident est du même ordre de grandeur que les dimensions caractéristiques de l'objet qui y est soumis. Cette diffusion s'exprime en $1/\lambda$ et est donc moins sensible à la longueur d'onde que la diffusion de Rayleigh.

A. 1. Illustration des différents régimes de diffusion

Les divers phénomènes que l'on observe dans le ciel illustrent ces trois régimes de diffusion. Le premier est la couleur du ciel. Sur le spectre de la lumière visible émise par le soleil, pour les couleurs de faible longueur d'onde (bleu – 480 nm) le phénomène de diffusion sur les petites particules de l'atmosphère (10 nm) est près de trois fois plus importante que pour les grandes longueurs d'onde (rouge - 650 nm). Lorsque le soleil est au zénith, l'épaisseur d'atmosphère à traverser est faible et seule la lumière bleue est diffusée, donnant sa couleur au ciel. Lorsque le soleil descend sur l'horizon, l'épaisseur d'atmosphère à traverser est plus importante et toutes les couleurs vont diffuser, jusqu'au rouge qui teinte le ciel. Le deuxième phénomène que l'on observe est la formation d'arc-en-ciel. Les dimensions des gouttes d'eau (pluie) sont alors de l'ordre du millimètre et c'est l'optique géométrique qui permet d'illustrer la décomposition du spectre visible dans ces micro-gouttelettes. Enfin la couleur des nuages illustre le régime de diffusion de Mie de la lumière du spectre visible. Les fines gouttelettes d'eau qui les composent diffusent toutes les longueurs d'onde de manière équivalente, ce qui donne leur couleur blanche aux nuages. Ils peuvent également être plus ou moins gris suivant la lumière qu'ils absorbent, en fonction de leur épaisseur. Ces phénomènes sont représentés Fig. I.1.



Fig. I.1 – **a.** Diffusion de Rayleigh, illustration par la couleur du ciel ; **b.** Diffusion de la lumière par des particules dont le diamètre est proche de la longueur d'onde, illustration par le phénomène d'arc-en-ciel ; **c.** Diffusion de Mie, illustration par la couleur des nuages.

Il est possible d'illustrer la diffusion de Rayleigh et de Mie par des expériences assez simples (**Communication**). Si l'on met en suspension du lait écrémé dans de l'eau en proportion faible et que l'on place une lampe d'un côté du récipient, en observant de l'autre côté on voit principalement une couleur bleue. En augmentant la concentration en lait écrémé on observe cette fois-ci de l'orange puis du rouge. Si on met du lait entier ou de la crème en suspension dans l'eau on observera un halo blanc uniquement, quelle que soit la concentration utilisée. Cela s'explique par le fait que le lait écrémé contient des molécules de lactose et des protéines (1-100 nm) mais peu de grosses molécules lipidiques qui sont plus nombreuses dans le lait entier ou la crème [ref 1]. On observe donc dans le premier cas la diffusion de Rayleigh qui dépend fortement de la longueur d'onde (analogie avec le ciel, l'épaisseur d'atmosphère étant assimilée à la concentration en molécules de lait écrémé) et dans le second cas la diffusion de Mie qui dépend très peu de la longueur d'onde et diffuse de manière isotrope (analogie avec le nuage). Ces expériences sont illustrées **Fig. I.2**.

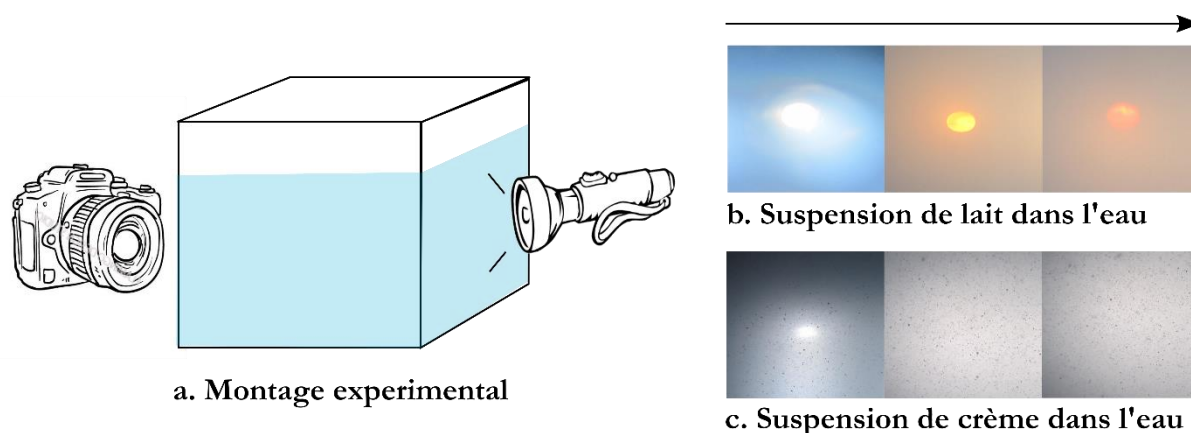


Fig. I.2 – **a.** Montage expérimental permettant d'étudier les différents régimes de diffusion d'une lumière blanche (LED) sur des particules en suspension de différentes tailles. **b.** Diffusion sur des particules de lait (1/2 écrémé) à différentes concentrations. La flèche indique l'augmentation de la concentration en particules de lait. Illustration de la diffusion de Rayleigh. **c.** Diffusion sur des particules de crème à différentes concentrations. La flèche indique également ici l'augmentation de la concentration en particules de crème. Illustration de la diffusion de Mie.

A. 2. Dimensions des objets manipulés par forces optiques

Si on considère une onde incidente dans le proche infrarouge (800 – 1550 nm) en interaction avec des objets inertes diélectriques et des objets biologiques, différents régimes de diffusion interviennent. Les objets inertes étudiés sont généralement de tailles nano-micrométriques. Les principaux sont des particules sphériques (silice, polystyrène), des nanofils (silicium, ZnO, argent) ou des nanotubes (carbone) [ref 2-8]. Les dimensions des principaux objets biologiques étudiés par méthodes optiques sont de l'ordre de la dizaine de nanomètres pour les protéines, de la centaine de nanomètres pour les virus, de 1 à 10 μm pour les bactéries, de 5 à 100 μm pour les champignons unicellulaires et de l'ordre de quelques microns pour les cellules eucaryotes (avec noyau). Les protéines, qui sont des macromolécules biologiques, constituent la brique de base des cellules vivantes (**Fig. I.3**).

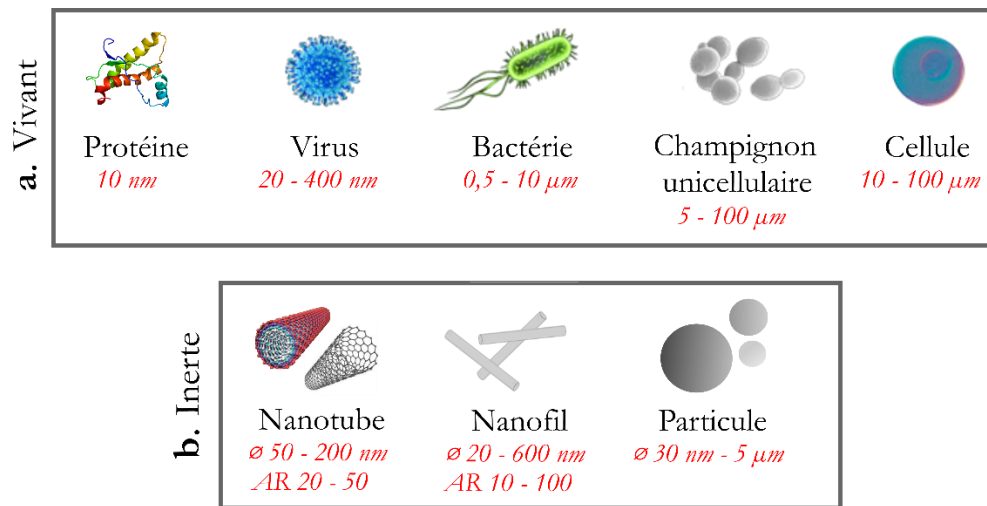


Fig. I.3 – Principaux objets (ainsi que leurs dimensions) étudiés par méthodes optiques : objets vivants (a) et objets inertes (b). *AR (Aspect Ratio)* désigne le rapport de dimension entre le diamètre et la longueur des structures.

A. 3. Modélisation des forces optiques

Il est intuitif que la lumière transporte de l'énergie, sous forme de chaleur. Le fait qu'elle puisse exercer des forces microscopiques (de l'ordre du μN par m^2) est plus complexe à imaginer, car ces forces ne sont pas visibles à notre échelle. Elles s'expliquent par le fait que la lumière transporte de la quantité de mouvement, et peut donc la transmettre [ref 9]. La force optique est généralement séparée en deux parties : la force de gradient F_{Grad} et la pression de radiation F_P . La première est assimilable à la force de réaction d'un ressort, la seconde à une celle d'une pression. Une troisième composante de la force optique est parfois décrite, elle est parfois désignée par le terme « force corrective » [ref 9]. Nous proposons ici de montrer la modélisation des forces de gradient et de pression de radiation dans l'approximation de Rayleigh et de l'optique géométrique. Nous assimilerons les objets étudiés à des particules sphériques. Pour la diffusion de Rayleigh, les forces sont décrites à partir de la formule de la force de Lorentz (A.3.a.). Lorsque la longueur d'onde du faisceau incident est faible devant les dimensions de l'objet éclairé c'est l'optique géométrique qui permet de modéliser ces forces (A.3.b.). Pour la diffusion de Mie, lorsque les dimensions caractéristiques de l'objet sont du même ordre que la longueur d'onde du rayonnement incident, les approximations faites dans les deux modélisations précédentes ne sont plus valables. Les forces optiques ne peuvent alors être calculées qu'au travers de l'équation de conservation du mouvement entre l'onde incidente et l'objet et au travers du tenseur de Maxwell. Cependant, devant la complexité de ces calculs, nous avons choisi de ne présenter que les modélisations de Rayleigh et de l'optique géométrique.

A. 3. a. Approximation de Rayleigh

Nous étudierons ce premier régime de diffusion avec l'exemple d'une sphère soumise à une onde incidente de champ électrique $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ et de champ magnétique $\mathbf{B}(\mathbf{r}, t)$. L'approximation de Rayleigh intervient dans le cas où cette particule sphérique possède un rayon inférieur à la longueur d'onde λ du faisceau incident, au minimum d'un ordre de grandeur. La sphère se comporte comme un dipôle et acquiert une polarisation (approximation dipolaire). Dans ce cas, elle subit de la part de l'onde incidente la force de Lorentz $\mathbf{F}_L(\mathbf{r}, t)$. Nous proposons de démontrer ici la contribution des forces optiques de gradient et de pression de radiation exercées par l'onde incidente sur la sphère à partir de la force de Lorentz.

Les propriétés de la sphère sont les suivantes : indice optique n_s , densité de charge $\rho_s(\mathbf{r},t)$, densité de courant $\mathbf{j}_s(\mathbf{r},t)$, densité de polarisation $\mathbf{P}(\mathbf{r},t)$ et moment dipolaire $\mathbf{p}(\mathbf{r},t)$.

Les propriétés du milieu incident sont les suivantes : son indice optique n_m , sa permittivité électrique relative ε_m , son champ électrique $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ et son champ magnétique $\mathbf{B}(\mathbf{r},t)$.

Par la suite, afin de ne pas surcharger les équations nous faisons le choix de ne plus faire apparaître la dépendance des différentes grandeurs ci-dessus en (\mathbf{r},t) .

Si on considère ν , un volume contenant la sphère, la force de Lorentz exercée par l'onde incidente sur l'objet s'exprime de la manière suivante :

$$\mathbf{F}_L = \int_{\nu} (\rho_s \mathbf{E} + \mathbf{j}_s \wedge \mathbf{B}) d\nu \quad [4]$$

Les relations suivantes permettent de lier la densité de polarisation \mathbf{P} aux densités de charge et de courant de la sphère :

$$\rho_s = -\text{div } \mathbf{P} \quad [2]$$

$$\mathbf{j}_s = \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} \quad [3]$$

Cela nous permet d'exprimer la force de Lorentz en fonction de la densité de polarisation :

$$\mathbf{F}_L = \int_{\nu} (-\text{div } \mathbf{P}) \mathbf{E} d\nu + \int_{\nu} \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} \wedge \mathbf{B} d\nu \quad [4]$$

A l'aide de la relation vectorielle [5] et du théorème de Green Ostrogradsky [6] qui implique une égalité entre l'intégrale de la divergence d'un champ vectoriel dérivable sur un volume ν et le flux de ce champ à travers la frontière de ce volume $\partial\nu$, on obtient l'expression de la force de Lorentz [7].

$$f \text{ div } \mathbf{a} = \text{div } (f\mathbf{a}) - \mathbf{a} \cdot \text{grad } (f) \quad [5]$$

$$\iiint_{\nu} \text{div } \mathbf{F} d\nu = \oint_{\partial\nu} \mathbf{F} \cdot d\mathbf{S} \quad [6]$$

$$\mathbf{F}_L = \int_{\nu} \mathbf{P} \cdot \text{grad } \mathbf{E} d\nu + \int_{\nu} \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} \wedge \mathbf{B} d\nu \quad [7]$$

Cette relation est celle que l'on retrouve dans la littérature, notamment dans les références [ref 9-12].

Dans le cadre de l'approximation dipolaire, les champs incidents $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ et $\mathbf{B}(\mathbf{r},t)$ peuvent être considérés comme des grandeurs physiques constantes sur le volume ν . On peut donc les sortir des intégrales :

$$\mathbf{F}_{L,dip} = \left(\int_{\nu} \mathbf{P} d\nu \right) \cdot \text{grad } \mathbf{E} + \left(\int_{\nu} \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} d\nu \right) \wedge \mathbf{B} \quad [8]$$

On définit le moment dipolaire \mathbf{p} selon la relation [9] :

$$\mathbf{p} = \int_{\nu} \mathbf{P} d\nu \quad [9]$$

Cela nous permet de simplifier la relation [8] sous la forme :

$$\mathbf{F}_{L,dip} = \mathbf{p} \cdot \text{grad } \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{p}}{\partial t} \wedge \mathbf{B} \quad [10]$$

L'expression [10] permet d'exprimer la valeur instantanée de la force à laquelle la sphère est soumise, assimilée ici à un point dipôle. Cependant, les fréquences optiques étant très élevées, seuls les effets moyens de cette force sont observables macroscopiquement. Nous calculons donc la moyenne temporelle de la force $F_{L,dip}$, avec T la période d'oscillation des champs :

$$\langle F_{L,dip} \rangle = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} (\mathbf{p} \cdot \mathbf{grad} \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{p}}{\partial t} \wedge \mathbf{B}) dt \quad [11]$$

Afin d'obtenir une dépendance de cette force uniquement au champ incident $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$, nous allons à présent introduire l'amplitude complexe des champs $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$, $\mathbf{B}(\mathbf{r},t)$ et du moment dipolaire $\mathbf{p}(\mathbf{r},t)$. Cela nous permet d'exprimer $\mathbf{p}(\mathbf{r},t)$ et $\mathbf{B}(\mathbf{r},t)$ en fonction du champ $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$.

$$\begin{aligned} \mathbf{E}(\mathbf{r},t) &= Re \{ \underline{\mathbf{E}}(\mathbf{r},t) \} \\ \mathbf{B}(\mathbf{r},t) &= Re \{ \underline{\mathbf{B}}(\mathbf{r},t) \} \\ \mathbf{p}(\mathbf{r},t) &= Re \{ \underline{\mathbf{p}}(\mathbf{r},t) \} \end{aligned} \quad [12]$$

Avec :

$$\begin{aligned} \underline{\mathbf{E}}(\mathbf{r},t) &= \mathbf{E}_0(\mathbf{r},w) e^{-iwt} \\ \underline{\mathbf{B}}(\mathbf{r},t) &= \mathbf{B}_0(\mathbf{r},w) e^{-iwt} \\ \underline{\mathbf{p}}(\mathbf{r},t) &= \mathbf{p}_0(\mathbf{r},w) e^{-iwt} \end{aligned} \quad [13]$$

Pour une sphère localisée en \mathbf{r} de rayon a nettement inférieur à la longueur d'onde λ du faisceau incident, on peut exprimer la dépendance du moment dipolaire au champ électrique grâce à la relation de **Clausius Mossotti** [ref 13,14] :

$$\mathbf{p}_0(\mathbf{r},w) = \epsilon_0 \epsilon_m \alpha \mathbf{E}_0(\mathbf{r},w) \quad [14]$$

avec ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide, ϵ_m la permittivité diélectrique relative du milieu qui entoure la particule et α la polarisabilité de la particule. Dans le cas général on peut décomposer α en une partie réelle et une partie complexe. Dans le cadre de l'approximation électrostatique cette décomposition se fait selon les relations [16,17] :

$$\alpha = \alpha_0 + i \alpha_1 \quad [15]$$

$$\alpha_0 = 4\pi a^3 \frac{\rho^2 - 1}{\rho^2 + 2} \quad \text{avec} \quad \rho = \frac{n_s}{n_m} \quad [16]$$

$$\alpha_1 = \frac{k^3}{6\pi} \alpha_0^2 \quad \text{avec } k \text{ nombre d'onde} \quad [17]$$

En notant $*$ le conjugué des valeurs complexes présentées précédemment, on obtient les relations :

$$\mathbf{E} = \frac{1}{2} (\underline{\mathbf{E}} + \underline{\mathbf{E}}^*); \quad \mathbf{B} = \frac{1}{2} (\underline{\mathbf{B}} + \underline{\mathbf{B}}^*); \quad \mathbf{p} = \frac{1}{2} (\underline{\mathbf{p}} + \underline{\mathbf{p}}^*) \quad [18]$$

On peut alors exprimer la relation [11] de la manière suivante :

$$\langle \mathbf{F}_{L,dip} \rangle = \frac{1}{4T} \int_{-T/2}^{T/2} \left((\underline{\mathbf{p}} + \underline{\mathbf{p}}^*) \cdot \mathbf{grad} (\underline{\mathbf{E}} + \underline{\mathbf{E}}^*) + \frac{\partial(\underline{\mathbf{p}} + \underline{\mathbf{p}}^*)}{\partial t} \wedge (\underline{\mathbf{B}} + \underline{\mathbf{B}}^*) \right) dt \quad [19]$$

En détaillant chacune des variables de cette relation, on obtient la relation [20] :

$$\langle \mathbf{F}_{L,dip} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} \{ \mathbf{p}_0 \cdot \mathbf{grad} \mathbf{E}_0^* - i\omega \mathbf{p}_0 \wedge \mathbf{B}_0^* \} \quad [20]$$

A l'aide de la relation [14] sur l'expression de \mathbf{p}_0 et de la relation de Maxwell [21], on peut remplacer les expressions de \mathbf{p}_0 et \mathbf{B}_0 dans l'expression [20] :

$$i\omega \mathbf{B}_0 = \nabla \wedge \mathbf{E}_0 \quad [21]$$

$$\langle \mathbf{F}_{L,dip} \rangle = \frac{\epsilon_0 \epsilon_m}{2} \text{Re} \{ \alpha \mathbf{E}_0 \cdot \mathbf{grad} \mathbf{E}_0^* + \alpha \mathbf{E}_0 \wedge (\nabla \wedge \mathbf{E}_0^*) \} \quad [22]$$

Le résultat du calcul de cette force sur la i-ème coordonnée (i=x, y, z) est :

$$\left(\langle \mathbf{F}_{L,dip} \rangle \right)_i = \frac{\epsilon_0 \epsilon_m}{2} \text{Re} \{ \alpha (E_0)_j \cdot \partial_i (E_0^*)_j \} \quad [23]$$

La relation [24] permet de modéliser un champ évanescent ou propagatif, lorsqu'il se propage dans une direction particulière (selon $\mathbf{k}\mathbf{r}$).

$$\mathbf{E}(r) = \mathbf{E}_0(r) e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}} \quad [24]$$

Dans ce cas, et en décomposant la polarisabilité de la particule α grâce aux relations [15-17] :

$$\left(\langle \mathbf{F}_{L,dip} \rangle \right)_i = \underbrace{\frac{\epsilon_0 \epsilon_m}{4} \alpha_0 \nabla |\mathbf{E}_0|^2}_{\boxed{1}} + \underbrace{\frac{\epsilon_0 \epsilon_m}{2} k \alpha_1 |\mathbf{E}_0|^2}_{\boxed{2}} - \underbrace{\frac{\epsilon_0 \epsilon_m}{2} \alpha_1 \text{Im}\{\mathbf{E}_0 \cdot \nabla \mathbf{E}_0^*\}}_{\boxed{3}} \quad [25]$$

Le terme $\boxed{1}$ correspond à l'expression des forces optiques de gradient, et le terme $\boxed{2}$ correspond à l'expression de la pression de radiation. Le terme $\boxed{3}$ est souvent négligé, considérant \mathbf{E}_0 comme un réel. Il peut être désigné comme étant une « force correctrice » car c'est ce terme qui permet de prendre en compte les phénomènes de diffusion, d'absorption de la sphère et de la forme du faisceau.

$\boxed{1}$ En remplaçant α_0 par son expression, la **force de gradient** a donc la forme suivante :

$$\mathbf{F}_{Grad} = \epsilon_0 \epsilon_m \pi a^3 \left(\frac{\rho^2 - 1}{\rho^2 + 2} \right) \nabla |\mathbf{E}_0|^2 \quad [26]$$

Comme son nom l'indique, cette force est dirigée selon le gradient de l'intensité lumineuse tout en étant proportionnelle à ce gradient. Elle a tendance à ramener la sphère dans les zones où le champ est maximal, zones qui correspondent à des puits de potentiel, comme illustré **Fig. I.4**.

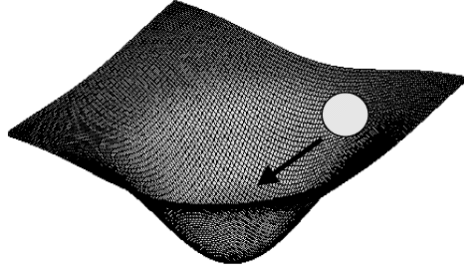


Fig. I.4 – Illustration du principe de fonctionnement de la force optique de gradient. Le puit de potentiel créé par l'onde électromagnétique incidente attire la sphère. Cette figure est extraite de [ref 9].

2 De même l'expression de la pression de radiation se présente sous la forme :

$$F_P = \frac{4}{3} \epsilon_0 \epsilon_m \pi k^4 a^6 \left(\frac{\rho^2 - 1}{\rho^2 + 2} \right)^2 |E_0|^2 \quad [27]$$

Cette force est toujours dirigée selon la direction de propagation du faisceau incident et est proportionnelle à son intensité lumineuse. A titre d'illustration, la pression de radiation permet aux dispositifs équipés de voiles solaires de se déplacer dans l'espace (**Fig. I.5**). La pression exercée par les photons sur ces grandes ailes réfléchissantes leur permet de se déplacer tels des voiliers dans l'espace.

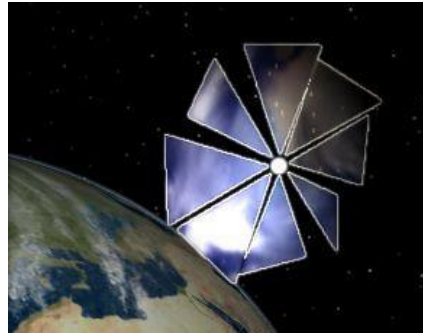


Fig. I.5 – Illustration de la voile solaire **Cosmos 1**, première voile solaire lancée dans l'espace (2005). Le mode de propulsion de ce dispositif est basé sur l'exploitation de la pression de radiation générée par les étoiles dans l'espace.

A. 3. b. Approximation de l'optique géométrique

Nous avons montré au paragraphe précédent le calcul des forces optiques de gradient et de pression de radiation dans le cas où les dimensions de l'objet étudié étaient largement inférieures à la longueur d'onde du faisceau incident. Lorsque les dimensions de l'objet sont largement supérieures à celles de la longueur d'onde du faisceau incident, c'est l'approximation de l'optique géométrique qui permet de représenter et de calculer ces forces optiques. Afin de ne pas surcharger cette première partie de calculs nous avons choisi de ne présenter ici que la représentation des forces optiques exercées sur une sphère, dans l'approximation de l'optique géométrique.

L'approche par l'optique géométrique est basée sur l'analyse de la quantité de mouvement des photons qui viennent interagir avec l'objet sphérique lorsqu'on l'éclaire. Les forces de pression de radiation interviennent lorsque l'éclairage de l'objet est uniforme tandis que les forces de gradient interviennent lorsque l'éclairage est non-uniforme (gradient de champ). Ces deux configurations sont représentées **Fig. I.6**.

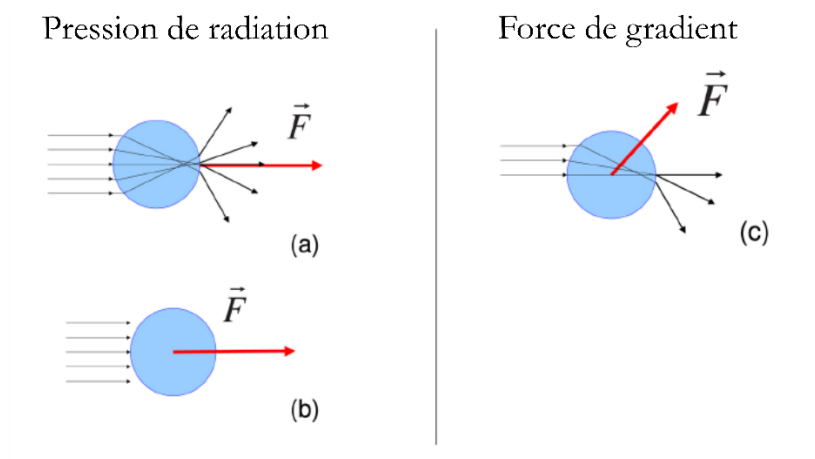


Fig. I.6 – Illustration des forces optiques de pression de radiation (a-b) et de gradient (c) dans le cas d’une sphère transparente (extrait de [ref 13]). Dans le cas d’un éclairage uniforme, la lumière peut être soit réfractée (a) soit absorbée (b), ce qui entraîne une variation de quantité de mouvement (et donc un déplacement) selon la direction de propagation de la lumière. Dans le cas d’un éclairage non uniforme la lumière est réfractée (c) ce qui entraîne un déplacement vers les régions de l’espace où l’intensité est la plus forte (c).

La pression de radiation est liée à des phénomènes de réfraction, d’absorption de la lumière à l’intérieur de l’objet sphérique éclairé lorsqu’il est transparent. Elle peut également être due à des phénomènes de réflexion et de diffusion à la surface de la sphère si elle est réfléchissante. Dans l’ensemble de ces cas, lorsque l’objet subit l’action des photons, on observe une variation de quantité de mouvement dans la direction de propagation de la lumière (**Fig. I.6a-b**).

La force de gradient est liée principalement aux phénomènes de réfraction et de réflexion. Lorsque l’objet est transparent, la force induite sur la sphère par l’onde incidente induit un déplacement vers la zone de forte intensité (**Fig. I.6c**). Au contraire si l’objet est réfléchissant, il peut être expulsé vers les zones d’intensité minimale.

A. 3. c. Conclusion

Les deux paragraphes précédents présentent les approximations qui sont usuellement faites pour modéliser les forces induites par un champ incident sur une sphère diélectrique. Le domaine de validité de ces approximations est cependant réduit. Il est évalué [ref 9] que pour des rayons de sphères compris entre $0,1\lambda$ et 25λ le calcul exact des forces exercées par une onde incidente plane ne peut pas être approximé par la modélisation de Rayleigh ou par celle de l’optique géométrique. Pour une longueur d’onde de $1,5\ \mu\text{m}$ cela correspond à des dimensions de sphères allant de $150\ \text{nm}$ à $37,5\ \mu\text{m}$. Pour les longueurs d’onde classiquement utilisées autour de $550\ \text{nm}$ cela correspond à des dimensions comprises entre $55\ \text{nm}$ et $13,75\ \mu\text{m}$. Cependant le calcul exact des forces est extrêmement complexe et nécessite plusieurs dizaines de pages de calcul [ref 9]. Bien que la plupart des objets étudiés et manipulés par forces optiques que nous allons présenter par la suite possèdent des dimensions ne pouvant se passer d’un calcul exact, nous avons choisi de ne pas présenter ce calcul. Les modélisations présentées précédemment montrent deux manières d’appréhender les forces optiques de gradient et de pression de radiation. Elles permettent de comprendre les interactions et phénomènes physiques en jeu ainsi que les déplacements de la sphère induits par ces forces.

B) Exploitations des forces optiques

La principale application qui est faite des forces optiques est la manipulation d'objets de tailles nano et micrométrique. Nous présenterons dans cette partie les principales applications liées au piégeage, au déplacement et au tri d'objets inertes et d'objets biologiques dont la taille maximale est de l'ordre de la dizaine de microns lorsqu'ils sont en suspension dans un milieu liquide. Nous avons également fait le choix de détailler principalement les applications basées sur l'utilisation de la force optique de gradient.

L'étude des objets de tailles nano et micrométriques peut être réalisée à l'échelle d'un grand nombre d'objets ou à l'échelle de l'objet unique. C'est cette dernière approche qui sera exploitée dans le cadre de cette thèse. Les forces optiques se prêtent particulièrement bien à cette approche car elles peuvent être utilisées à l'échelle d'un ou de quelques objets. Cette caractérisation est très en rupture des approches traditionnellement utilisées en microbiologie, qui sont fondées sur l'étude statistique d'un grand nombre d'objets biologiques et l'étude à l'échelle des populations cellulaires.

B. 1. Les pièges optiques

Afin de manipuler ces objets lorsqu'ils sont en suspension dans un milieu liquide, il faut pouvoir exercer sur eux une force qui permet de restreindre leur déplacement afin de les contraindre à rester confinés dans un faible volume que l'on désigne comme étant un « piège ».

B. 1. a. Pinces optiques

Les travaux de *Ashkin et al.* [ref 15] datant de 1986 sont parmi les premiers à proposer un piégeage par forces optiques de gradient au travers d'un faisceau laser fortement focalisé ($\lambda=514.5$ nm). Cette méthode permet de piéger des particules colloïdales de polystyrène ou de silice d'un diamètre compris entre $0,26\ \mu\text{m}$ et $10\ \mu\text{m}$. Il est cependant observé que les billes de polystyrène sont endommagées par les puissances lasers utilisées pour le piégeage (de la fraction de milliwatt à quelques centaines de milliwatts), ce sur quoi nous reviendrons par la suite. Une année plus tard, en 1987, la même équipe a démontré qu'il était possible de piéger des virus (virus de la mosaïque du tabac) et des bactéries (dont *E. coli*) avec le même dispositif [ref 16]. Les virus ont pu être piégés pour des puissances lasers à partir de 100 à 300 mW sans dommages visibles. Les bactéries nécessitent une puissance de piégeage plus réduite (quelques milliwatts) et sont endommagées à partir de puissance de piégeage de l'ordre de 100 mW.

Ces travaux, illustrés **Fig. I.7**, démontrent qu'il est possible de piéger des objets inertes et biologiques de tailles nano-micrométriques par l'action des forces de gradient. Le faisceau laser focalisé est désigné par le terme de « pince optique ». Les objets piégés sont confinés longitudinalement et latéralement au niveau du point focal du laser et peuvent le rester pendant plusieurs minutes à plusieurs heures [ref 15,16]. Ils peuvent être ensuite manipulés en déplaçant le faisceau laser focalisé, ouvrant la porte à de nombreuses applications.

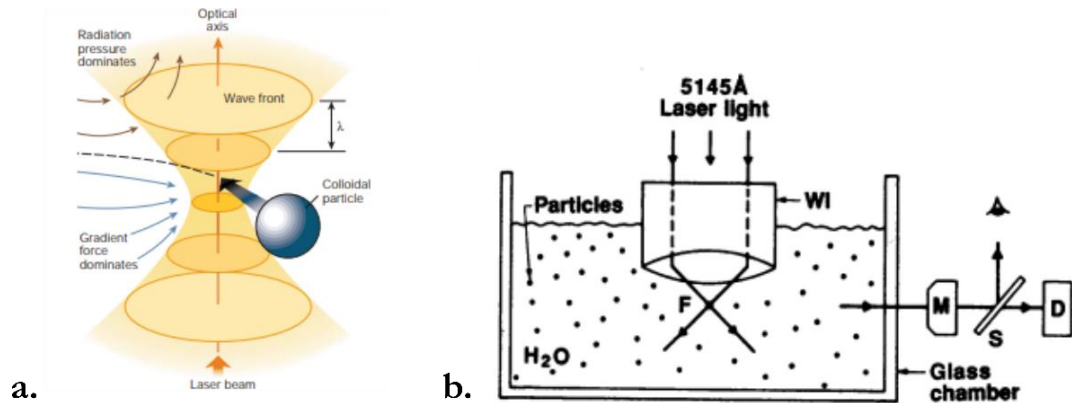


Fig. I.7 – a. Schéma d'une pince optique. Elles permettent de piéger des objets de tailles nano-micrométriques grâce à la focalisation d'un faisceau laser. Le gradient d'intensité attire les objets au point focal par forces optiques de gradient (extrait de [ref 17]). **b.** Principe du piégeage optique de particules, virus ou bactéries (extrait de [ref 16]).

B. 1. b. Optique intégrée

Il existe également des méthodes de piégeage optique basées sur l'utilisation du champ proche (dit évanescent), en opposition au champ lointain (radiatif) des pinces optiques. Cela nécessite la fabrication de structures optiques intégrées sur puces de type guide d'onde, résonateur optique ou cristal photonique.

1. Les guides d'onde

Dans les guides, les ondes se propagent et sont accompagnées d'une partie évanescente qui se recouvre avec le milieu de faible indice qui entoure le guide. La décroissance rapide du champ évanescent crée une force optique de gradient forte, capable de piéger des objets (**Fig. I.8**).

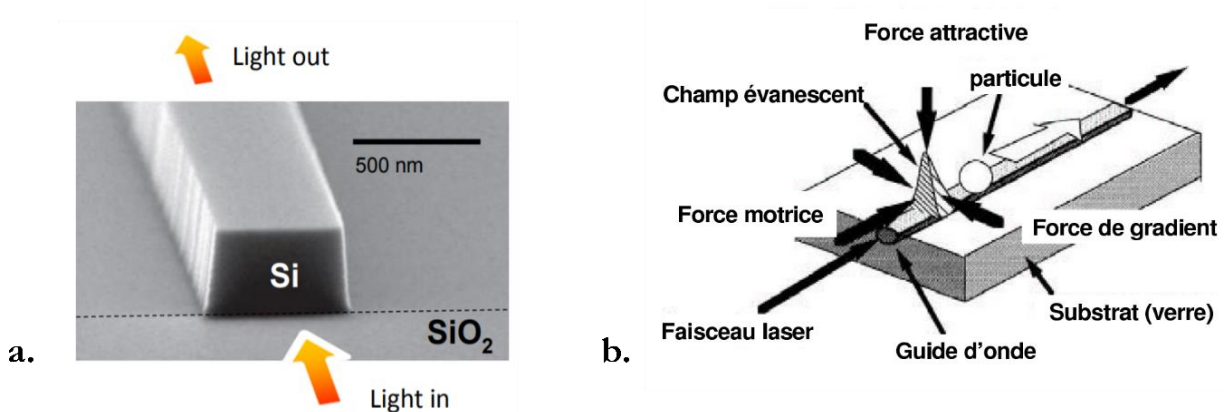


Fig. I.8 – a. Exemple de guide d'onde silicium (fabriqué dans nos laboratoires), image MEB. **b.** Principe de fonctionnement du piégeage de particules par le champ évanescent d'un guide d'onde en optique intégrée (extrait de [ref 13]).

Les guides d'onde sont les structures optiques les plus primaires. Ils sont communément utilisés pour guider la lumière et permettent d'amener cette dernière dans des structures plus complexes de type anneaux résonants ou cristaux photoniques.

2. Les anneaux résonants

Ces structures résonnantes ont des dimensions importantes et sont donc multimodes, c'est à dire que plusieurs longueurs d'onde peuvent résonner à l'intérieur. La lumière est classiquement amenée à ces structures par un guide d'onde situé à proximité de l'anneau. Les longueurs d'onde de résonance vont ensuite se coupler de manière évanescente à l'anneau. Un second guide d'onde peut être utilisé pour récupérer le champ électromagnétique aux longueurs d'onde résonnantes (toujours par couplage évanescent). Ces anneaux peuvent, entre autre, prendre la forme de microtores/microdisques (couplage de champ par fibre optique, **Fig. I.9a**) [ref 18,19] ou d'anneaux planaires (**Fig. I.9b-c**) [ref 20-22].

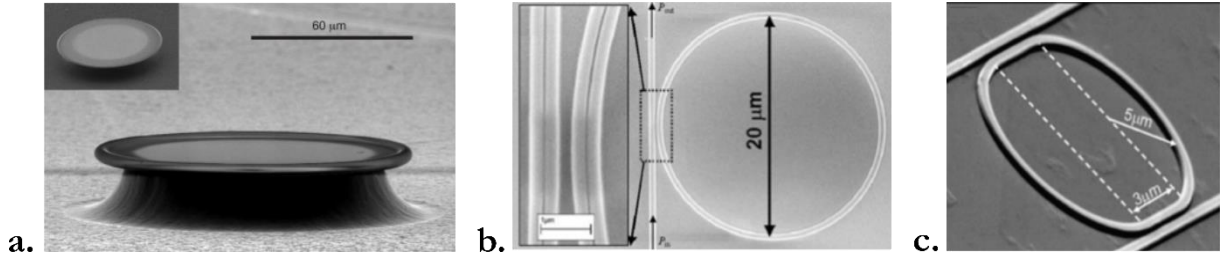


Fig. I.9 – Images MEB de différentes structures d'anneaux résonants. **a.** Microdisque de silice dont le diamètre est compris entre 80 et 120 μm (extrait de [ref 18]). **b.** Anneau résonant basé sur des guides d'ondes silicium à fente (extrait de [ref 20]). **c.** Anneau résonant fabriqué en SOI et possédant un guide d'injection et un de collection (extrait de [ref 21]).

3. Les cristaux photoniques

Les cristaux photoniques permettent également de confiner et d'exalter les champs évanescents. Ils sont constitués de réseaux périodiques de trous dans des matériaux diélectriques et concentrent un champ électromagnétique intense dans un défaut de ce réseau. Ce défaut peut être dans le matériau de fort (**Fig. I.10b-1**) ou de faible indice (**Fig. 10b-2**). Il existe différents types de cristaux photoniques, nous présentons notamment **Fig. 10** des exemples de cristaux photoniques 2D [ref 23,24] et de cristaux photoniques 1D (linéiques) également désignés par le terme cavité nanobeam dans de nombreuses références [ref 25] .

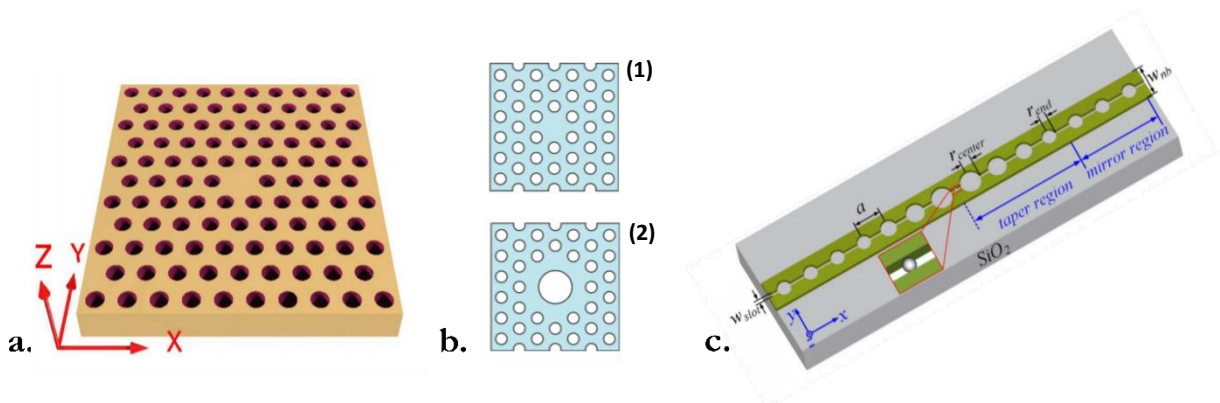


Fig. I.10 – **a.** Exemple de cristal photonique 2D, simulation (extrait de [ref 23]). **b.** Cristaux photoniques 2D permettant de confiner le champ électromagnétique dans le matériau d'indice fort (1) ou faible (2) (extrait de [ref 24]). **c.** Cristal photonique 1D, cavité « nanobeam » à fente en silicium (extrait de [ref 25]).

B. 1. c. Conclusion

Les deux principaux dispositifs de piégeage optiques sont donc les pinces optiques en champ lointain et les structures optiques intégrées en champ proche. Le principal avantage des pinces optiques réside dans la simplicité de leur mise en place et de leur utilisation. Une limitation est celle liée à la limite de diffraction. Elle empêche de focaliser le faisceau propagatif en un point plus petit que l'ordre de grandeur de sa longueur d'onde. Les puissances de piégeage doivent donc être importantes pour piéger les objets, ce qui peut en endommager certains, notamment les objets biologiques. Un autre inconvénient de ces pinces est l'encombrement des dispositifs utilisés. Les micro et nanotechnologies permettent actuellement de miniaturiser les fonctions de manipulation et d'analyse aux seins de dispositifs « Lab-on-a-Chip ». En ce sens, les structures de piégeage intégrées apportent de nombreuses solutions et ouvrent la voie à de nouvelles applications.

B. 2. Manipulation d'objets inertes

La fonction première des pièges optiques est d'isoler des objets et de les maintenir à un endroit précis. Les pinces optiques [ref 15,17,26] comme les structures intégrées sur silicium [ref 27,29-32] permettent ainsi d'isoler une ou plusieurs particules colloïdales (Fig. I.11).

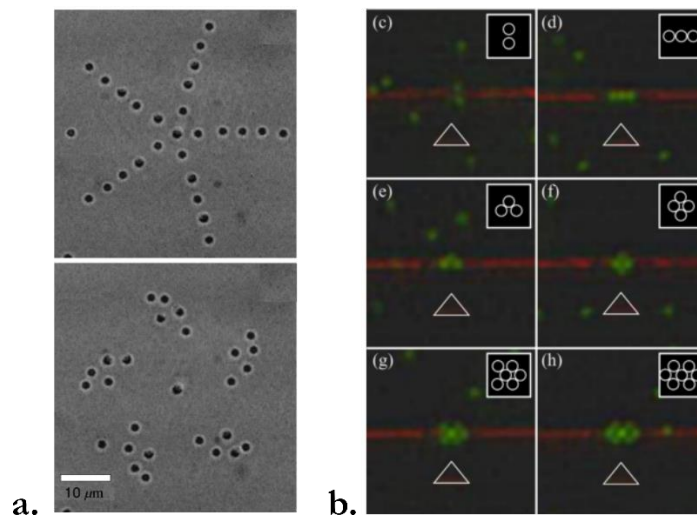


Fig. I.11 – a. Piégeage de billes de silice de $0.99\ \mu\text{m}$ de diamètre assemblées selon différents motifs par pinces optiques holographiques (extrait de [ref 26]). **b.** Assemblage de 2 à 7 particules de polystyrène (diamètre de $1\ \mu\text{m}$) sur un cristal photonique 1D (extrait de [ref 27]).

Cela permet notamment d'assembler plusieurs particules selon un motif précis [ref 26,27], ou encore d'effectuer des mesures sur cet objet immobile. On peut ainsi piéger des particules à l'aide de pinces optiques [ref 28], de cristaux photoniques [ref 29,30] ou de guides d'onde [ref 31-33] et les analyser par spectroscopie Raman afin de les caractériser (composition chimique), de les identifier ou de détecter des molécules à la surface de la particule.

Une fois piégés les objets peuvent être déplacés, soit grâce à la pression de radiation le long des guides d'onde [ref 31,34,35] soit en divisant et modifiant le faisceau des pinces optiques [ref 26,28] ou encore en déplaçant la pince. On peut également orienter des objets non-sphériques tels que des nanofils [ref 36,] ou des nanotubes de carbone [ref 37,38], qui ont tendance à s'aligner dans l'axe du faisceau ou le long du

champ évanescent des structures optiques intégrées. Les forces optiques peuvent également être utilisées pour assembler des objets et créer par exemple un réseau bidimensionnel de billes de polystyrène de 520 nm de diamètre, espacées de 860 nm [ref 39] ou encore des chaînes de particules d'or de 200 nm de diamètre orientables en modifiant la polarisation du faisceau incident [ref 40]. Ces deux applications, basées sur l'utilisation d'un cristal photonique 2D, sont illustrées **Fig. I.12**.

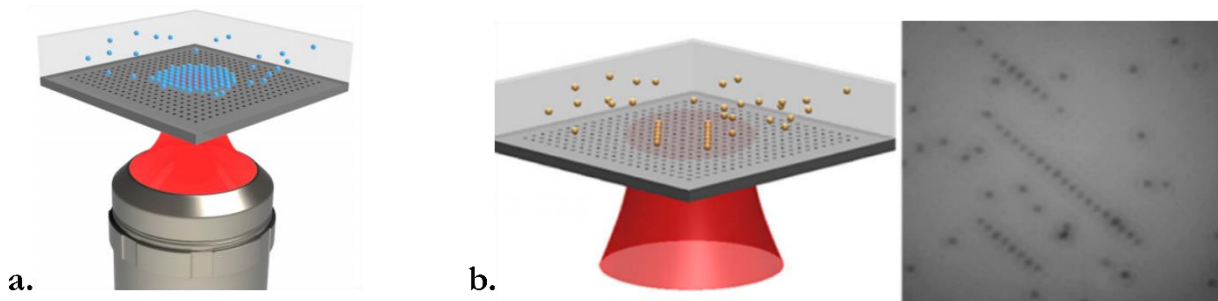


Fig. I.12 – **a.** Piégeage de billes de polystyrène de 520 nm de diamètre, espacées de 860 nm sur un cristal photonique, couplage de mode par le biais d'un faisceau laser à 1,55 μm (extrait de [ref 39]). **b.** Assemblage de chaînes de particules d'or de 200 nm de diamètre, orientées selon la polarisation du faisceau incident sur un cristal photonique 2D (extrait de [ref 40]).

Les pièges optiques permettent de manipuler des objets de petites dimensions pour assurer des fonctions spécifiques (nano-outils, **Fig. I.13**). On peut par exemple utiliser une bille de polystyrène de 190 nm de diamètre pour déterminer le profil d'une surface avec une précision en-dessous de la limite de diffraction [ref 41]. Il est également possible d'imager le champ d'une cavité résonnante (cristal photonique 1D) en observant les déplacements d'une bille de polystyrène de 500 nm de diamètre piégée [ref 42].

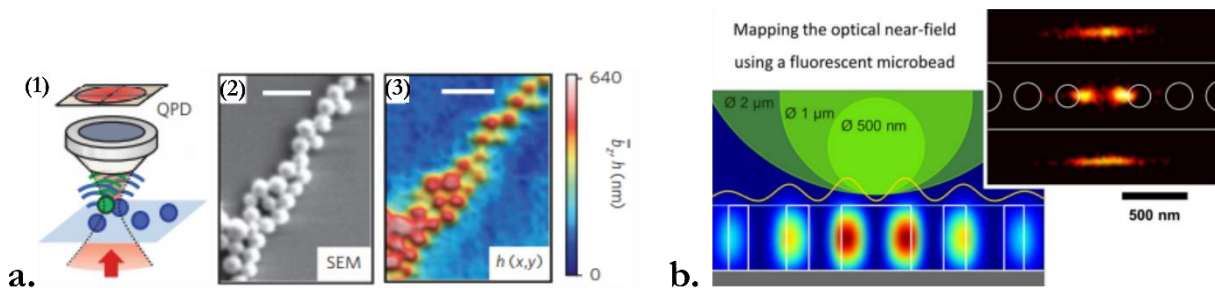


Fig. I.13 – **a.** (1) Dispositif de pince optique permettant de sonder la topologie d'une surface, ici un amas de billes de 280-500 nm de diamètre. (2) Image MEB de l'amas de billes à imager et (3) reconstruction de la topologie de l'échantillon grâce au dispositif (extrait de [ref 41]). **b.** Imagerie du champ d'une cavité nanobeam par piégeage d'une nanoparticule de 500 nm de diamètre (extrait de [ref 42]).

L'ensemble de ces applications de manipulation d'objets inertes permet à la fois de mieux comprendre les forces optiques et leur interaction avec les objets piégés. Elles permettent également de trier et d'assembler des objets mais également de créer des nano-outils permettant d'assurer des fonctions spécifiques. Cette liste non-exhaustive montre la diversité des utilisations que nous pouvons faire des forces optiques concernant la manipulation d'objets inertes (billes, nanofils, nanotubes). Nous allons à présent montrer qu'il existe également de nombreuses applications concernant la manipulation d'objets biologiques.

B. 3. Manipulation d'objets biologiques

Comme évoqué au paragraphe précédent, la fonction première des pièges optiques est d'isoler des objets. Les dispositifs présentés fonctionnent également pour le piégeage d'objets biologiques comme des biomolécules [ref 43-46], des virus [ref 16,47,48], des bactéries [ref 16,49-52] ou des cellules de type globules rouges, globules blancs ou des cellules rénales embryonnaires humaines [ref 53-55]. Quelques-uns de ces exemples sont illustrés Fig. I.14.

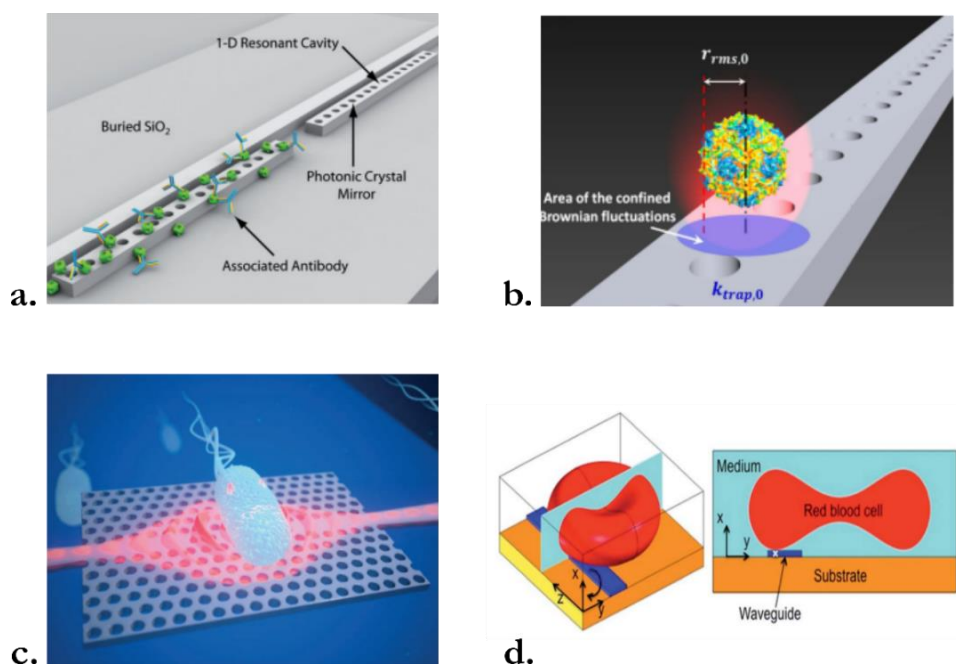


Fig. I.14 – a. Piégeage et détection d'anticorps grâce à un cristal photonique 1D fonctionnalisé (antigènes) (extrait de [ref 43]). b. Piégeage du virus de la grippe pour la détection de l'interaction virus-anticorps sur cavité nanobeam (extrait de [ref 47]). c. Piégeage de la bactérie *E. coli* sur un cristal photonique 2D (extrait de [ref 49]). d. Piégeage d'un globule rouge sur un guide d'onde afin d'étudier sa déformabilité (extrait de [ref 53]).

Ces pièges optiques sont utilisés également pour analyser les objets piégés. Il est par exemple possible d'étudier la déformabilité des globules rouges lorsqu'ils sont piégés par un guide d'onde en pentaoxyde de tantale (Ta₂O₅) sur des substrats en silice [ref 53]. Cette information sur la déformabilité des globules rouges est primordiale pour des transfusions sanguines : une perte de déformabilité peut subvenir lors du stockage du sang et entraîner des complications une fois ce dernier injecté au patient. On peut également étudier l'interaction de molécules (antigènes) ou de virus (grippe) avec des anticorps [ref 43,47] en détectant cette interaction dans la partie évanescente du champ de cristaux photoniques 1D. Les anneaux résonants, dont le facteur de qualité est élevé ($Q \sim 10^5$ - 10^6) [ref 56-58], sont particulièrement adaptés à la détection (molécules, bactéries) au travers du décalage de la longueur d'onde de résonance [ref 56].

Ils peuvent également être utilisés pour étudier la mobilité des bactéries ou l'interaction qu'elles ont entre elles [ref 59]. Ces informations nous permettent de mieux comprendre leur agrégation et le fonctionnement des biofilms. L'utilisation de pinces optiques holographiques permet la manipulation de plusieurs pièges en parallèle et le piégeage simultané de plusieurs cellules souches embryonnaires en trois dimensions. Cela permet une meilleure compréhension de leur interaction et de celles qu'elles peuvent avoir avec leur environnement [ref 60].

Les pinces optiques peuvent également être utilisées pour piéger des nano-outils comme présentés précédemment pour étudier certaines propriétés ou l'intérieur des cellules (**Fig. I.15**). Des nanofils de GaN piégés sont par exemple utilisés pour sonder la membrane de cellules cervicales humaines cancéreuses [ref 61]. Il est également possible d'insérer une particule d'or de 80 nm dans une cellule vivante (ovaire d'hamster chinois), ouvrant la voie à des applications d'administration de médicaments intracellulaire [ref 62].

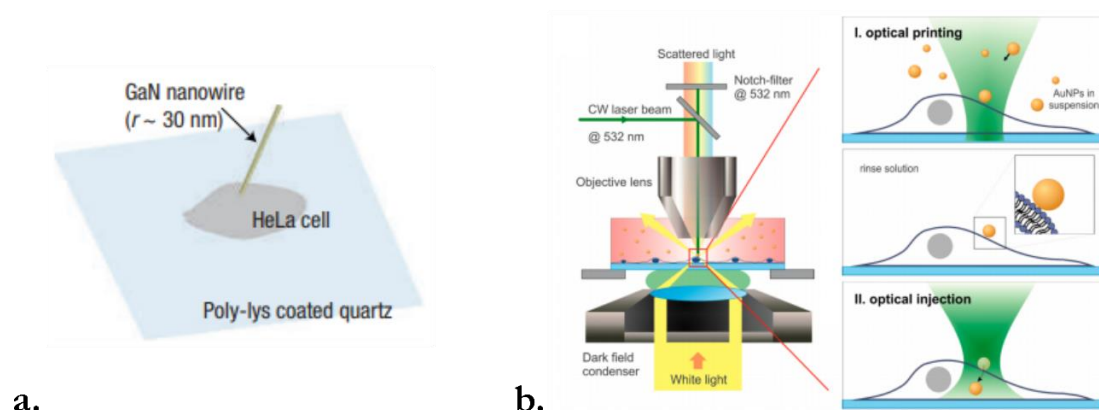


Fig. I.15 – **a.** Nanofils de GaN manipulés par pinces optiques et utilisés pour sonder la membrane d'une cellule cervicale humaine cancéreuse (HeLa) (extrait de [ref 61]). **b.** Insertion d'une particule d'or de 80 nm de diamètre dans une cellule vivante ovarienne (hamster chinois) grâce à une pince optique (extrait de [ref 62]).

L'utilisation des forces optiques de piégeage sont nombreuses dans le domaine de la biologie et de la microbiologie et il serait ambitieux d'en donner une liste exhaustive. Manipuler des objets biologiques (et inertes) par forces optiques présente de nombreux intérêts, mais également quelques limites, présentés dans le paragraphe suivant.

B. 4. Intérêts et limites

De manière générale les dispositifs basés sur l'utilisation de structures optiques de piégeage sont relativement simple à mettre en place. Elles permettent des méthodes d'analyse directes, rapides et nécessitant peu d'ajout d'agents chimiques. De plus, les pièges optiques sont réversibles et permettent donc la réutilisation des objets étudiés. Cela peut être extrêmement intéressant dans le cadre de différentes méthodes d'analyse appliquées au même objet ou dans le cas d'un faible nombre d'objets à étudier.

Le fait de pouvoir étudier des objets individuellement présente de nombreux avantages. C'est particulièrement le cas pour les objets biologiques car cela permet une meilleure compréhension des mécanismes des différents organismes étudiés et des interactions qu'ils peuvent avoir avec d'autres ou avec leur environnement. Les techniques classiques de biologie ne permettent souvent pas cette étude, reposant sur l'étude moyenne d'un large nombre d'objets. Les réponses individuelles ne sont donc classiquement pas étudiées et peuvent avoir une très forte influence.

Cependant, les puissances optiques de piégeage ou les longueurs d'onde utilisées peuvent parfois endommager les objets manipulés par forces optiques. De nombreuses études ont permis d'étudier l'influence de ces paramètres sur la viabilité des bactéries ou des cellules de manière plus générale dans le cadre de l'utilisation des pinces optiques [ref 50, 63-66]. Les informations qui ressortent de ces études concernent tout d'abord la longueur d'onde de piégeage. En dessous de 800 nm, les dommages engendrés par les phénomènes d'absorption à deux photons sont plus importants. Entre 800 nm et 1064 nm les

longueurs d'ondes qui engendrent le moins de dommages sur les bactéries seraient de 830 nm et 970 nm, avec des dommages deux fois moins importants qu'à 1064 nm. Il a également été montré que la sensibilité des bactéries *E. coli* augmente avec la puissance de piégeage et que des puissances aussi faibles que 18 mW pouvaient les endommager. Ces études révèlent cependant que ces valeurs de longueur d'onde et de puissance limite dépendent des conditions expérimentales telles que la composition de l'environnement (notamment en matière d'oxygène) et du temps de piégeage.

Certains travaux évoquent également les dommages qui peuvent être causés à certains objets inertes. Les travaux de la référence [ref 15] ont montré que les dommages occasionnés par une pince optique à $\lambda=514,5$ nm sur des particules dépendent du matériau et du diamètre de ces objets. Des particules de latex de polystyrène de diamètre 1 μm en suspension dans l'eau ne sont pas détériorées avant plusieurs dizaines de minutes, celles dont le diamètre est de 173 nm résistent plusieurs minutes à une puissance de l'ordre du milliwatt. Pour des billes de 109 nm de diamètre les dommages apparaissent à partir de 25 secondes à 12-15 mW tandis que pour les particules de 38 nm et 85 nm de diamètre les dommages sont si rapides qu'il est impossible de les observer. Pour les billes de silice cependant, aucun endommagement n'a été constaté.

Nous montrons donc ici que les pinces optiques peuvent causer des dommages importants sur les objets piégés de par les longueurs d'onde et les puissances utilisées. Les structures intégrées de piégeage optique présentent l'avantage de piéger les objets dans la partie évanescence du champ. Les puissances en action sont de l'ordre du μW et sont donc moins susceptibles d'endommager les objets piégés. Le gradient de champ très important dans ces structures permet effectivement un piégeage à plus faible puissance. Cette problématique de l'endommagement des objets piégés est primordiale pour une étude pertinente des objets biologiques, d'autant plus si l'on s'intéresse à l'état de ces objets lorsqu'ils sont soumis à un agent extérieur.

C) Cristaux photoniques 1D (cavités linéiques) et 2D (cavités creuses)

C. 1. Description générale

Les laboratoires LTM et CEA/SiNaPs travaillent depuis une dizaine d'année sur la caractérisation de microcavités et le piégeage de particules diélectriques [ref 67-69]. Ces travaux ont pu montrer la pertinence de ces structures optiques pour des applications telles que le piégeage [ref 27], l'assemblage [ref 27], la détection et la manipulation [ref 70-71] de billes de diamètre compris entre 0,5 μm et 2 μm . Ils ont également permis d'imager le champ d'une structure à cristaux photoniques 1D à cavité CMT au travers du piégeage de 0,5 μm [ref 42]. Un exemple de structure est montré Fig. I.16a.

Les cristaux photoniques 2D à cavités creuses développés par le laboratoire de Romuald Houdré ont permis le piégeage, la manipulation et l'analyse de billes de polystyrène de diamètre compris entre 250 nm et 500 nm [ref 24,30,72,73]. Un exemple de ces structures optiques est montré Fig. I.16b.

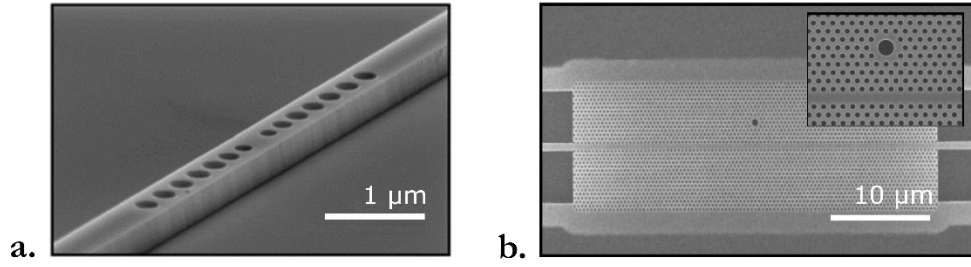


Fig. I.16 – Images MEB de structures optiques. **a.** Cristal photonique 1D en silicium sur isolant (SOI). **b.** Cristal photonique 2D à cavité creuse en silicium suspendu (membrane).

C. 2. Les cristaux photoniques 1D – Cavités linéiques CMT_N

Les microcavités linéiques réalisées sur SOI consistent en un guide d'onde d'environ 1 cm de long, 250 nm de haut et 500 nm de large dont les extrémités s'évasent en largeur pour former ce que l'on appelle des « tapers d'injection et de collection » (**Fig. I.17a**). Ces derniers favorisent l'injection de la lumière dans le guide d'onde. En effet la section du cœur de la fibre d'injection que nous utilisons est de 8 μm et le fait d'augmenter la largeur du guide d'onde à 5 μm en face clivée permet de limiter les pertes à l'injection. Au centre du guide d'onde sont gravées deux séries de trous sur toute l'épaisseur du silicium. Ces deux séries de trous ont une fonction de transfert équivalente à celle d'un système Fabry Péro. Ils font donc office de miroirs entre lesquels la lumière injectée dans la structure va être concentrée. Ce phénomène de résonance ne fonctionne que pour une longueur d'onde (longueur d'onde de résonance) dans le cas de ces cristaux photoniques 1D car ils sont dimensionnés pour être monomodes.

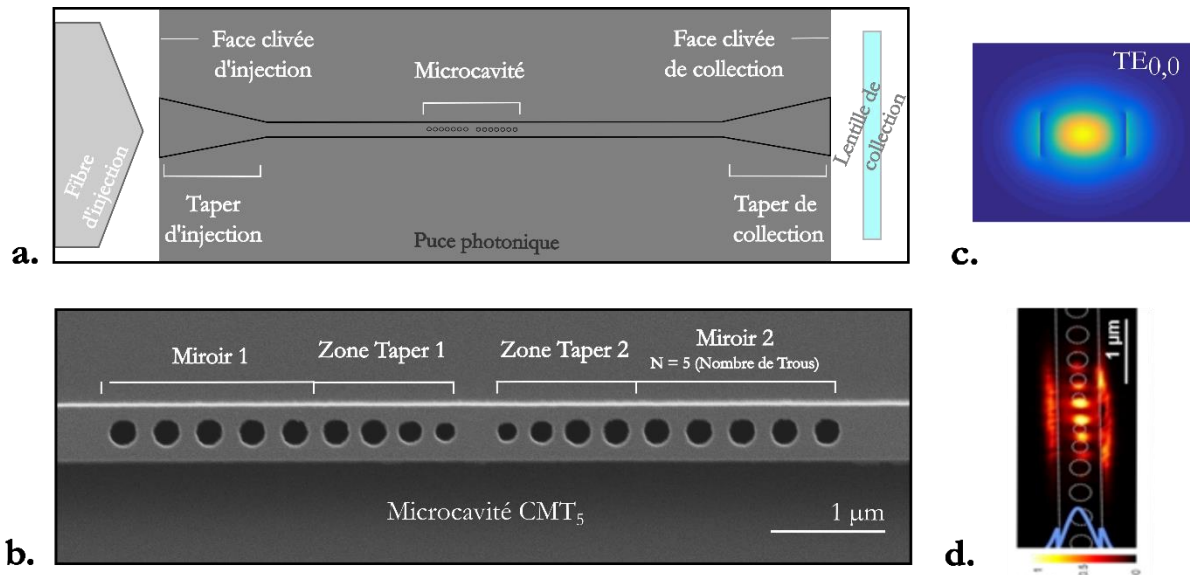


Fig. I.17 – **a.** Description d'une puce photonique comportant une microcavité linéique dite CMT (cristal photonique 1D). La lumière est injectée par la fibre d'injection dans le taper d'injection et est collectée par la lentille de collection après son passage dans la microcavité. Schéma de principe, les différents éléments ne sont pas à l'échelle. **b.** Image MEB d'une microcavité CMT₅ et du rôle des différents trous du cristal photonique. **c.** Mode $TE_{0,0}$ pour lequel sont dimensionnées ces structures optiques, vue en coupe du guide d'onde. **d.** Image champ proche de la répartition de champ dans la microcavité.

Les tapers d'injection et de collection présentent des dimensions plus importantes et sont donc multimodes. Leur utilisation implique donc des contraintes supplémentaires. Pour le taper d'injection, le fait d'autoriser la propagation dans plusieurs modes implique que la lumière se répartie entre ces différents modes. Le mode unique pour lequel a été dimensionné le cristal photonique ($TE_{0,0}$) présentera donc une intensité moindre que si il avait été le seul mode injecté (**Fig. I.17c**). Après sélection du mode $TE_{0,0}$ par le cristal photonique, les dimensions du taper de collection peuvent à nouveau amener de nouveaux modes (réflexions parasites, imperfections...). Afin de favoriser le caractère monomode du cristal, la polarisation est sélectionnée à l'injection (boucles de Lefebvre) et à la collection (polariseur). Ces tapers d'injection et de collection permettent d'obtenir un signal transmis jusqu'à 7 fois plus intense et apportent donc un confort non négligeable pour les mesures expérimentales.

Les cristaux photoniques 1D concentrent la lumière dans ce que l'on appelle une microcavité CMT_N . Ils sont constitués de deux séries de trous qui délimitent le centre de la cavité (**Fig. I.17b**). Chaque série de trous est composée d'une zone taper et d'une zone miroir. Dans la zone taper, le diamètre des trous augmente du centre de la microcavité vers les miroirs. Ces tapers sont des tapers d'adaptation. Ils permettent d'adapter le mode de la lumière qui se propage dans le guide d'onde au mode de la microcavité pour le taper 1 et inversement pour le taper 2 et donc de limiter les pertes. La partie miroir permet de concentrer la lumière et donc de créer un champ électromagnétique suffisamment intense pour piéger des objets. C'est le nombre N de trous dans le miroir qui définit le nom de la microcavité CMT_N .

C. 3. Les cristaux photoniques 2D – Cavités creuses

Les cristaux photoniques 2D SOI fabriqués à l'EPFL sont suspendus (membrane) de manière à maximiser le confinement de la lumière. De la même manière que pour les cristaux photoniques 1D c'est un guide d'onde avec taper d'injection (et de collection) qui guide la lumière dans la cavité. Une fois à proximité du cristal photonique la partie évanescente du champ électromagnétique du guide se couple au cristal qui va concentrer la lumière dans un défaut. Ce dernier est un trou de dimensions plus importantes que ceux du cristal (**Fig. I.18**). Les dimensions du cristal 2D sont calculées afin d'obtenir une structure monomode ($TE_{0,0}$), comme précédemment. Une seule longueur d'onde (de résonance) peut donc être concentrée par le cristal et utilisée pour piéger des objets.

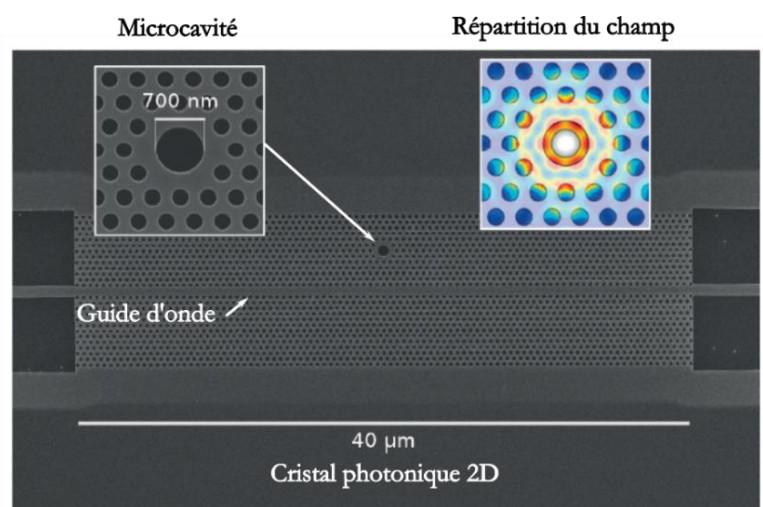


Fig. I.18 – Description d'une structure de piégeage à cristaux photoniques 2D. Le guide d'onde amène la lumière à proximité du cristal. Elle est ensuite couplée de manière évanescente dans le cristal et résonne dans la microcavité. La répartition de champ de cette microcavité est également présentée (simulation d'éléments finis (FEM) sur Comsol).

C. 4. Caractéristiques des structures optiques de piégeage

Les structures optiques de piégeage sont caractérisées principalement par trois paramètres : la longueur d'onde de résonance $\lambda_{\text{rés}}$, le facteur de qualité Q et le volume modal V (au travers du rapport Q/V). Le facteur de qualité caractérise la capacité d'une structure optique à confiner la lumière. Il représente physiquement le nombre d'aller-retours effectués par un photon dans la cavité. Il se calcule de la manière suivante, avec $\lambda_{\text{rés}}$ la longueur d'onde de résonance de la structure et ΔL la largeur à mi-hauteur de la résonance : $Q = \lambda_{\text{rés}} / \Delta L$.

On cherche à maximiser l'intensité lumineuse dans le volume de la cavité et donc à limiter les pertes par fuites vers l'extérieur. La loi de Purcell permet de lier le taux maximal d'émission dans les modes du résonateur α_{MAX} , le facteur de qualité Q , le volume élémentaire dans la cavité $V/(\lambda/n)^3$ avec n l'indice dans la cavité [ref 74-76]:

$$\alpha_{\text{MAX}} = \frac{3 Q \left(\frac{\lambda}{n}\right)^3}{4\pi^2 V} \quad [28]$$

Les systèmes à privilégier sont ceux présentant un fort facteur de qualité Q et un petit volume modal V . Les microcavités des cristaux photoniques 1D et 2D décrits précédemment présentent un très faible volume modal de l'ordre de quelques $(\lambda/n)^3$. Ces systèmes présentent l'avantage de diminuer le nombre de modes possibles et donc d'augmenter le confinement d'un mode unique.

En modifiant la géométrie des cristaux photoniques, on peut modifier la longueur d'onde de résonance $\lambda_{\text{rés}}$, le facteur de qualité Q et le volume modal V . Pour la longueur d'onde de résonance et le volume modal cela dépend directement des dimensions du cristal (taille et emplacement des trous, cotes de la structure). Pour le facteur de qualité cela dépend principalement du nombre de trous dans le cristal. Pour les cristaux photoniques 1D, le facteur de qualité augmente avec le nombre de trous dans le miroir ($Q=2700$ pour une CMT3 vs $Q=20\,000$ pour une CMT5 et $Q=58\,000$ pour une CMT7 [ref 67]). Pour les cristaux photoniques 2D c'est le nombre de lignes dans le cristal qui permet de faire varier le facteur de qualité. Le facteur de qualité est également fonction de la qualité de la fabrication (impureté, rugosité des flancs).

L'ordre de grandeur des paramètres caractéristiques de ces structures à cristaux photoniques 1D et 2D sont présentées dans le tableau de la **Fig. I.19** (facteur de qualité Q et volume modal V) [ref 67,77,78]. Ces valeurs correspondent aux structures fabriquées et utilisées pour le piégeage dans les deux laboratoires correspondant et sont largement inférieures aux records pouvant être atteints [ref 79-80].

	<i>Cristaux photoniques 1D</i> <i>Cavités CMT_N</i>	<i>Cristaux photoniques 2D</i> <i>Cavités creuses</i>
<i>Facteur de Qualité Q</i>	2 000 – 15 000	2 000 – 15 000
<i>Volume modal V</i>	$\approx 0,4 (\lambda/n)^3$	$\approx 2,3 (\lambda/n)^3$
<i>Raideur du piège</i>	1 pN/μm/mW	300 pN/μm/mW

Fig. I.19 - Tableau résumant les facteurs de Qualité et le volume modal des structures à cristaux photoniques 1D, 2D. La raideur des pièges est également renseignée [ref 42,81].

Ces deux types de cristaux photoniques présentent donc des propriétés similaires, avec toutefois une raideur de piège plus importante de deux ordres de grandeurs. Les structures optiques à facteur de qualité réduit ($Q < 15\,000$) permettent le piégeage des objets étudiés. Un facteur de qualité élevé est idéal pour la détection d'objets [ref 56], mais ne permet pas d'enregistrer une signature de piégeage et de caractériser l'objet piégé.

D) Conclusion et enjeux

Les applications de piégeage par forces optiques de gradient au travers des pinces optiques ou des structures optiques intégrées sur puce sont nombreuses. Elles concernent autant la manipulation d'objets inertes que biologiques. Les avantages des dispositifs utilisant ces pièges optiques sont : la facilité d'utilisation et de mise en place, rapidité, manipulation d'objets uniques et surtout la compatibilité avec la photonique silicium.

Les cristaux photoniques 1D et 2D sont des objets conçus et fabriqués avec une extrême précision pour atteindre des facteurs de qualité de l'ordre de 10^4 - 10^5 [ref 79-80]. La pertinence de leur utilisation pour la manipulation de billes de polystyrène est démontrée depuis une dizaine d'années [ref 67-73].

Le principal enjeu de cette thèse est d'étudier en nanophotonique des systèmes colloïdaux issus du vivant. Les bactéries sont des objets biologiques de taille micrométrique et sont au cœur de problématiques actuelles de santé publique. La transition du piégeage d'entités inertes à vivantes présente de nombreux défis. Les principaux sont le design et la fabrication de structures adaptées en facteur de qualité et l'adaptation du dispositif de piégeage et d'analyse. Les interactions entre une bactérie unique piégée et le champ de ces structures optiques pourraient nous apporter des informations de première importance sur la bactérie mais également sur l'état dans lequel elle se trouve. Ces travaux se situent à l'interface entre nanophotonique et microbiologie.

Références

- [1] *Introduction à l'étude du lait*. C. B. O'Connor, B. R. Tripathi, *Centre International pour l'Élevage en Afrique* (1991).
- [2] *Microrheology with optical tweezers: Measuring the relative viscosity of solutions 'at a glance'*. M. Tassieri, F. Del Giudice, E. J. Robertson, N. Jain, B. Fries, R. Wilson, A. Glidle, F. Greco, P. A. Netti, P. L. Maffettone, T. Bicanic & J. M. Cooper, *Scientific Reports* **5**, 8831 (2015).
- [3] *Local viscosity probed by photonic force microscopy*. A. Pralle, E.-L. Florin, E. H. K. Stelzer, J. K. H. Hörber, *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **66**, S71–S73 (1998).
- [4] *Optical trapping and integration of semiconductor nanowire assemblies in water*. P. J. Pauzauskie, A. Radenovic, E. Trepagnier, H. Shro, P. Yang, and J. Liphardt, *Nature Materials* **5**, 97–101 (2006).
- [5] *Controllable orientation of single silver nanowire using two fiber probes*. X. Xu, C. Cheng, H. Xin, H. Lei, and B. Li, *Scientific Reports* **4**, 3989 (2014).
- [6] *In-plane trapping and manipulation of ZnO nanowires by hybrid plasmonic field*. L. Zhang, X. Dou, C. Min, Y. Zhang, L. Du, Z. Xie, J. Shen, Y. Zeng, and X. Yuan, *Nanoscale* **8**, 9756-9763 (2016).
- [7] *Angular orientation of nanorods using nanophotonic tweezers*. P. Kang, X. Serey, Y.-F. Chen, and D. Erickson, *Nano Letters* **12**, 12, 6400-6407 (2012).
- [8] *Optical orientation and shifting of a single multiwalled carbon nanotube*. H. Xin and B. Li, *Light: Science & Applications* **3**, e205 (2014).
- [9] *Modélisation de forces optiques*. O. Moine, *Thèse Aix-Marseille 3* (2005).
- [10] *Evanescent light scattering: the validity of the dipole approximation*. P. C. Chaumet, A. Rahmani, F. de Fornel, and J.-P. Dufour, *Phys. Rev. B* **58**, 4, 2310-2315 (1998).
- [11] *Coupled Dipole Method Determination of the Electromagnetic Force on a Particle over a Flat Dielectric Substrate*. P. C. Chaumet and M. Nieto-Vesperinas, *Phys. Rev. B* **61**, 20, 14119-14127 (2000).
- [12] *Time averaged total force on a dipolar sphere in an electromagnetic field*. P. C. Chaumet and M. Nieto-Vesperinas, *Optics Letters* **25**, 15, 1065-1067 (2000).
- [13] *Déplacement de particules et d'objets biologiques sur des guides d'ondes*. S. Gaugiran, Biophysique, Université Joseph-Fourier - Grenoble I (2005).
- [14] *Biological applications of optical forces*. K. Svoboda and S. M. Block. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures* **23**, 247–285 (1994).
- [15] *Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles*. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, *Optics Letters* **11**, 5, 288–290 (1986).
- [16] *Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria*. A. Ashkin and J. M. Dziedzic, *Science* **235**, 4795, 1517-1520 (1987).

- [17] *A revolution in optical manipulation*. D. G. Grier, *Nature* **424**, 810–816 (2003).
- [18] *Ultra-high- Q toroid microcavity on a chip*. D. K. Armani, T. J. Kippenberg, S. M. Spillane & K. J. Vahala, *Nature* **421**, 925–928 (2003).
- [19] *Heavy water detection using ultra-high- Q microcavities*. A. M. Armani and K. J. Vahala, *Optics Letters* **31**, 12 (2006).
- [20] *Experimental demonstration of guiding and confining light in nanometer-size low-refractive-index material*. Q. Xu, V. R. Almeida, R. R. Panepucci, and M. Lipson, *Optics Letters* **29**, 14 (2004).
- [21] *An integrated optic ethanol vapor sensor based on a silicon-on-insulator microring resonator coated with a porous ZnO film*. N. A. Yebo, P. Lommens, Z. Hens, and R. Baets, *Optics Express* **18**, 11, 11859–11866 (2010).
- [22] *Optical ring resonators for biochemical and chemical sensing*. Y. Sun and X. Fan, *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 205–211(2011).
- [23] *Optical trapping near a photonic crystal*. A. Rahmani¹ and P. C. Chaumet, *Optics Express* **14**, **13**, 6353–6358 (2006).
- [24] *Piégeage optique résonant et analyse du mouvement de nanoparticules piégées dans des cristaux photoniques à cavités creuses*. M. L. H. Tonin, *Thèse de l'Ecole Polytechnique fédérale de Lausanne* (2016).
- [25] *Single nanoparticle trapping based on on-chip nanoslotted nanobeam cavities*. D. Yang, F. Gao, Q.-T. Cao, C. Wang, Y. Ji and Y.-F. Xiao, *Photonics Research* **6**, 2 (2018).
- [26] *Dynamic Holographic Optical Tweezers*. J. E. Curtis, B. A. Koss, D. G. Grier. *Opt. Commun.* **207**, 169–175 (2002).
- [27] *Assembly of microparticles by optical trapping with a photonic crystal nanocavity*. C. Renaut, J. Dellinger, B. Cluzel, T. Honegger, D. Peyrade, E. Picard, F. De Fornel, E. Hadji, *Applied Physics Letters* **100**, 101103 (2012).
- [28] *Optical trapping and manipulation of nanostructures*. O. M. Maragò, P. H. Jones, P. G. Gucciardi, G. Volpe, and A. C. Ferrari, *Nature Nanotechnology* **8**, 11, 807–819 (2013).
- [29] *Surface-Enhanced Raman Scattering with Ag Nanoparticles Optically Trapped by a Photonic Crystal Cavity*. S. Lin, W. Zhu, Y. Jin, and K. B. Crozier, *Nano Lett.* **13**, 2, 559–563 (2013).
- [30] *Single particle detection, manipulation and analysis with resonant optical trapping in photonic crystals*. N. Deschermes, U. Perumal Dharanipathy, Z. Diao, M. Tonin and R. Houdre, *Lab on a chip* **13**, 3268–3274 (2013).
- [31] *Serial raman spectroscopy of particles trapped on a waveguide*. P. Løvhaugen, B. S. Ahluwalia, T. R. Huser, and O. G. Hellesø, *Optics Express* **21**, 3, 2964–2970 (2013).
- [32] *On-chip optical trapping and raman spectroscopy using a triplex dual-waveguide trap*. M. Boerkamp, T. van Leest, J. Heldens, A. Leinse, M. Hoekman, R. Heideman, and J. Caro, *Optics Express* **22**, 25, 30528–30537 (2014).
- [33] *A nanotweezer system for evanescent wave excited surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) of single nanoparticles*. L. Kong, C. Lee, C. M. Earhart, B. Cordovez, and J. W. Chan, *Optics Express* **23**, 5, 6793–6802 (2015).

- [34] *Sorting of polystyrene microspheres using a Y-branched optical waveguide*. K. Grujic, O. Hellesø, J. Hole, and J. Wilkinson, *Optics express* **13**, 1, 1–7 (2005).
- [35] *Stability analysis of optofluidic transport on solid-core waveguiding structures*. A. H. J. Yang and D. Erickson, *Nanotechnology* **19**, 4, 045704 (2008).
- [36] *Determining the 3d orientation of optically trapped upconverting nanorods by in situ single-particle polarized spectroscopy*. P. Rodríguez-Sevilla, L. Labrador-Páez, D. Wawrzyńczyk, M. Nyk, M. Samoć, A. Kumar Kar, M. D. Mackenzie, L. Paterson, D. Jaquea and P. Haro-González, *Nanoscale* **8**, 1, 300-308 (2016).
- [37] *Angular Orientation of Nanorods Using Nanophotonic Tweezers*. P. Kang, X. Serey, Y.-F. Chen and D. Erickson, *Nano Letters* **12**, 12, 6400-6407 (2012).
- [38] *Optical orientation and shifting of a single multivalled carbon nanotube*. H. Xin and B. Li, *Light: Science & Applications* **3**, 9, e205 (2014).
- [39] *Light-Assisted, Templated Self-Assembly Using a Photonic-Crystal Slab*. E. Jaquay, L. J. Martínez, C. A. Mejia, and M. L. Povinelli, *Nano Lett.* **13**, 5, 2290–2294 (2013).
- [40] *Light-Assisted, Templated Self-Assembly of Gold Nanoparticle Chains*. E. Jaquay, L. Javier Martínez, N. Huang, C. A. Mejia, D. Sarkar and M. L. Povinelli, *Nano Lett.* **14**, 5184–5188 (2014).
- [41] *Surface imaging beyond the diffraction limit with optically trapped spheres*. L. Friedrich and A. Rohrbach, *Nature Nanotechnology* **10**, 12, 1064-1069 (2015).
- [42] *Optofluidic Near-Field Optical Microscopy: Near-Field Mapping of a Silicon Nanocavity Using Trapped Microbeads*. C. Pin, B. Cluzel, C. Renaut, E. Picard, D. Peyrade, E. Hadji, and F. de Fornel, *ACS Photonics* **2**, 10, 1410-1415 (2015).
- [43] *A multiplexed optofluidic biomolecular sensor for low mass detection*. S. Mandal, J. M. Goddard, and D. Erickson, *Lab Chip* **9**, 2924-2932 (2009).
- [44] *Trapping-Assisted Sensing of Particles and Proteins Using On-Chip Optical Microcavities*. S. Lin and K. B. Crozier, *ACS Nano* **7**, 1725-1730 (2013).
- [45] *Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection*. M. R. Lee and P. M. Fauchet, *Opt. Express* **15**, 4530 (2007).
- [46] *1-D and 2-D Photonic Crystals as Optical Methods for Amplifying Biomolecular Recognition*. S. Pal, P. M. Fauchet, and B. L. Miller, *Anal. Chem.* **84**, 8900-8908 (2012).
- [47] *Nanophotonic detection of freely interacting molecules on a single influenza virus*. P. Kang, P. Schein, X. Serey, D. O'Dell, and D. Erickson, *Sci. Rep.* **5**, 12087 (2015).
- [48] *Optical trapping of individual human immunodeficiency viruses in culture fluid reveals heterogeneity with single-molecule resolution*. Y. Pang, H. Song, J. H. Kim, X. Hou and W. Cheng, *Nature Nanotechnology* **9**, 624-630 (2014).

- [49] *Cavity-enhanced optical trapping of bacteria using a silicon photonic crystal*. T. van Leeuwen and J. Caro, *Lab Chip* **13**, 4358-4365 (2013).
- [50] *Sorting Out Bacterial Viability with Optical Tweezers*. M. Ericsson, D. Hanstorp, P. Hagberg, J. Enger and T. Nyström, *Journal of Bacteriology* **182**, 19, 5551–5555 (2000).
- [51] *Single-cell bacterium identification with a SOI optical microcavity*. M. Tardif, J.-B. Jager, P. R. Marcoux, K. Uchiyama, E. Picard, E. Hadji, and D. Peyrade, *Applied Physics Letters* **109**, 133510 (2016).
- [52] *Gram-type Differentiation of Bacteria with 2D Hollow Photonic Crystal Cavities*. R. Therisod, M. Tardif, P. R. Marcoux, E. Picard, E. Hadji, D. Peyrade and R. Houdré, *Applied Physics Letters* (2018).
- [53] *Squeezing red blood cells on an optical waveguide to monitor cell deformability during blood storage*. B. Singh Ahluwalia, P. McCourt, A. Oteiza, J. S. Wilkinson, T. R. Huserd and O. G. Hellesø, *Analyst* **140**, 223 (2015).
- [54] *Optofluidic rotation of living cells for single-cell tomography*. T. Kolb, S. Albert, M. Haug, and G. Whyte, *Journal of Biophotonics* **8**, 3, 239-246 (2015).
- [55] *Optical tweezers for single cells*. H. Zhang and K.-K. Liu, *J. R. Soc. Interface* **5**, 671–690 (2008).
- [56] *A universal biosensing platform based on optical micro-ring resonators*. A. Ramachandran, S. Wang, J. Clarke, S. J. Ja, D. Goad, L. Wald, E. M. Flood, E. Knobbe, J. V. Hryniewicz, S. T. Chu, D. Gill, W. Chen, O. King, B. E. Little, *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 7, 939-944 (2008).
- [57] *High- ring resonators in thin silicon-on-insulator*. T. Baehr-Jones, M. Hochberg, C. Walker and A. Scherer, *Appl. Phys. Lett.* **85**, 16, 3346-3347 (2004).
- [58] *High confinement micron-scale silicon nitride high Q ring resonator*. A. Gondarenko, J. S. Levy and M. Lipson, *Optics Express* **17**, 14, 11366-11370 (2009).
- [59] *Optically Trapped Bacteria Pairs Reveal Discrete Motile Response to Control Aggregation upon Cell–Cell Approach*. M. Dienerowitz, L. V. Cowan, G. M. Gibson, R. Hay, M. J. Padgett, and V. R. Phoenix, *Current Microbiology* **69**, 5, 669-674 (2014).
- [60] *Precision Assembly of Complex Cellular Microenvironments using Holographic Optical Tweezers*. G. R. Kirkham, E. Britchford, T. Upton, J. Ware, G. M. Gibson, Y. Devaud, M. Ehrbar, M. Padgett, S. Allen, L. D. Buttery and K. Shakesheff, *Scientific Reports* **5**, 8577 (2015).
- [61] *Optical trapping and integration of semiconductor nanowire assemblies in water*. P. J. Pauzauskie, A. Radenovic, E. Trepagnier, H. Shro, P. Yang, and J. Liphardt, *Nature Materials* **5**, 2, 97-101 (2006).
- [62] *Optical injection of gold nanoparticles into living cells*. M. Li, T. Lohmüller, and J. Feldmann, *Nano Letters* **15**, 1, 770-775 (2014).
- [63] *Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption*. K. König, H. Liang, M. W. Berns, and B. J. Tromberg, *Opt. Lett.* **21**, 1090 (1996).

- [64] *Physiological monitoring of optically trapped cells: assessing the effects of confinement by 1064-nm laser tweezers using microfluorometry.* Y. Liu, G. J. Sonek, M. W. Berns, and B. J. Tromberg, *Biophys. J.* **71**, 2158-2167 (1996).
- [65] *Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps.* K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block, *Biophys. J.* **77**, 2856-2863 (1999).
- [66] *Optical Tweezers Cause Physiological Damage to Escherichia coli and Listeria Bacteria.* M. B. Rasmussen, L. B. Oddershede, and H. Siegmundfeldt, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2441 (2008).
- [67] *Ingénierie de mode en optique intégrée sur silicium sur isolant.* P. Velha, Université Paris Sud - Paris XI (2008).
- [68] *Nanopinces optiques sur puce pour la manipulation de particules diélectriques.* C. Renaut, Université de Bourgogne (2014).
- [69] *Piégeage et manipulation d'objets colloïdaux à l'aide de structures photoniques en silicium intégrées dans des puces optofluidiques.* C. Pin, Université de Bourgogne (2016).
- [70] *On Chip shapeable optical tweezers.* C. Renaut, B. Cluzel, J. Dellinger, L. Lalouat, E. Picard, D. Peyrade, E. Hadji and F. de Fornel, *Scientific Report* **3**, 2290 (2013).
- [71] *Optofluidic taming of a colloidal dimer with a silicon nanocavity.* C. Pin, B. Cluzel, C. Renaut, D. Peyrade, E. Picard, E. Hadji and F. de Fornel, *Applied Physics Letters* **105**, 171108 (2014).
- [72] *Single particle detection, manipulation and analysis with resonant optical trapping in photonic crystals.* N. Descharmes, U. P. Dharanipathy, Z. Diao, M. Tonin, and R. Houdré, *Lab on a chip* **13**, 3268, 74 (2013).
- [73] *Observation of Backaction and Self-Induced Trapping in a Planar Hollow Photonic Crystal Cavity.* N. Descharmes, U. P. Dharanipathy, Z. Diao, M. Tonin, and R. Houdré, *Physical Review Letters* **110**, 123601 (2013).
- [74] *Matériaux artificiels : ingénierie de dispersion des micro-ondes à l'optique.* O. Vanbesien, *Lavoisier* (2012).
- [75] *Spontaneous emission probabilities at radio frequencies.* E. Purcell, *Physical Review*, **69**, 11, 681 (1946).
- [76] *Optical microcavities.* K. Vahala, *World Scientific Pub Co Inc*, **424** (2004).
- [77] *Piégeage optique résonant et analyse du mouvement de nanoparticules piégées dans des cristaux photoniques à cavités creuses.* M. L. H. Tonin, EPFL (2016).
- [78] *Toward ultimate miniaturization of high Q silicon traveling-wave microresonators.* M. Soltani, Q. Li, S. Yegnanarayanan, and A. Adibi, *Optics Express* **18**, 19 (2010).
- [79] *Ultra-High Q/V Fabry-Perot microcavity on SOI substrate.* P. Velha, E. Picard, T. Charvolin, E. Hadji, J. C. Rodier, P. Lalanne, and D. Peyrade, *Optics Express* **15**, 24 (2007).
- [80] *High-Q photonic nanocavity in a two-dimensional photonic crystal.* Y. Akahane, T. Asano, B.-S. Song & S. Noda, *Nature* **425** (2003).
- [81] *Thermal fluctuation analysis of singly optically trapped spheres in hollow photonic crystal cavities.* M. Tonin, F. M. Mor, L. Forró, S. Jeney, and R. Houdré, *Appl. Phys. Lett.* **109**, 241107 (2016).

II. Dispositif expérimental

A) Design de microcavités

- A. 1. Optimisation de la géométrie des cristaux photoniques 1D
 - A. 1. a. Indice effectif de la structure
 - A. 1. b. Paramètres de calcul
 - A. 1. c. Design de microcavités
- A. 2. Cartographie de champ
 - A. 2. a. Cartographie 2D
 - A. 2. b. Cartographie 3D
- A. 3. Conclusion

B) Fabrication

- B. 1. Cristaux photoniques 1D
- B. 2. Cristaux photoniques 2D
- B. 3. Conclusion

C) Microfluidique

D) Montage

- D. 1. Montage préexistant
- D. 2. Montage développé
 - D. 2. a. Système de visualisation
 - D. 2. b. Porte échantillon régulé en température
 - D. 2. c. Optimisation des conditions de couplage
 - D. 2. d. Dispositif à deux lasers
 - D. 2. e. Montage expérimental final

E) Conclusion

Les cristaux photoniques 1D et 2D que nous utilisons sont au cœur d'un dispositif permettant initialement le piégeage et l'analyse de billes de polystyrène de taille micronique. Ce chapitre présente le développement du dispositif réalisé au cours de mon doctorat, dans le but de l'adapter au piégeage de bactéries. Ce développement a concerné à la fois les structures optiques (design et dimensions), le système microfluidique, le système d'imagerie, le banc optique, le support des échantillons et le traitement des données.

A) Design de microcavités

En amont de la fabrication de structures optiques, une première étape de calculs numériques (simulation) est nécessaire. Elle permet de calculer les dimensions optimales de ces structures, dans le but de piéger des objets biologiques. L'objectif est de définir la longueur d'onde de résonance, le facteur de qualité de la structure, de favoriser le mode de cavité et de maximiser les forces optiques induites par le gradient de la partie évanescente du champ.

Dans cette partie seront uniquement détaillés les calculs numériques réalisés pour l'optimisation de structures à cristaux photoniques 1D. Ils ont été réalisés par méthode de calcul FDTD (Finite Difference Time Domain) [ref 1] sur le logiciel Rsoft Fullwave. Deux types de modélisation ont été réalisés : en deux dimensions (2D) ou en trois dimensions (3D). Si la 3D est plus précise que la simulation 2D, elle est également plus coûteuse en temps. Pour l'optimisation de la géométrie des cristaux photoniques 1D une modélisation 2D a été utilisée (A. 1.). Afin de cartographier la répartition du champ dans ces structures, des modélisations 2D et 3D ont été effectuées (A. 2.).

A. 1. Optimisation de la géométrie des cristaux photoniques 1D

A. 1. a. Indice effectif de la structure

Le calcul 2D est réalisé en approximant la structure optique 3D à une structure 2D dont l'une des dimensions est infinie. Plusieurs configurations sont réalisables, celle que nous avons exploitée est représentée **Fig. II.1**. Ce choix a été motivé par le besoin d'optimiser les dimensions du cristal photonique, ce qui nécessite de décrire avec précision le plan xy (dimension z infinie).

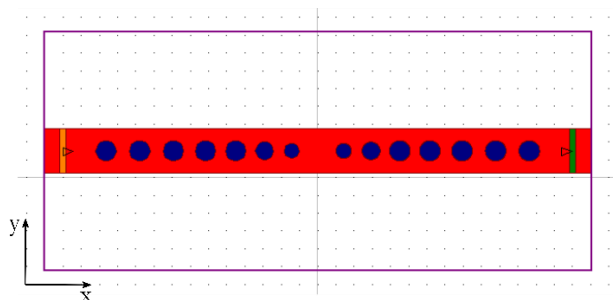


Fig. II.1 – Modélisation 2D d'un cristal photonique 1D à microcavité CMT3 sur le logiciel de modélisation numérique Rsoft Fullwave. La source de lumière est représentée en jaune et le détecteur en vert.

L'indice de réfraction de la structure optique est remplacé par son indice effectif « n_{eff} » afin de prendre en compte la dimension verticale (axe z) finie. L'indice effectif est calculé à partir des indices des matériaux de la structure, de leurs dimensions et varie en fonction du mode guidé. Il est représentatif de l'indice « ressenti » par le mode optique se propageant dans la structure : du point de vue de l'onde électromagnétique, c'est comme si elle se propageait dans un milieu homogène dont l'indice est l'indice effectif, intermédiaire entre la structure optique et son environnement (milieu, SiO_2). Afin d'évaluer l'indice effectif d'une microcavité pour les calculs 2D, nous l'avons d'abord modélisée en 3D. Nous avons ensuite cherché quel indice effectif en 2D permet d'obtenir des résultats équivalents à la 3D.

Comme l'indice effectif est fonction de son environnement nous l'avons déterminé pour un cristal photonique 1D dans l'air ou immergé dans l'eau déionisée (EDI). Les valeurs trouvées sont respectivement $n_{\text{eff,AIR}} = 2,894$ et $n_{\text{eff,EDI}} = 2,867$. Ces résultats sont représentés **Fig. II.2**.

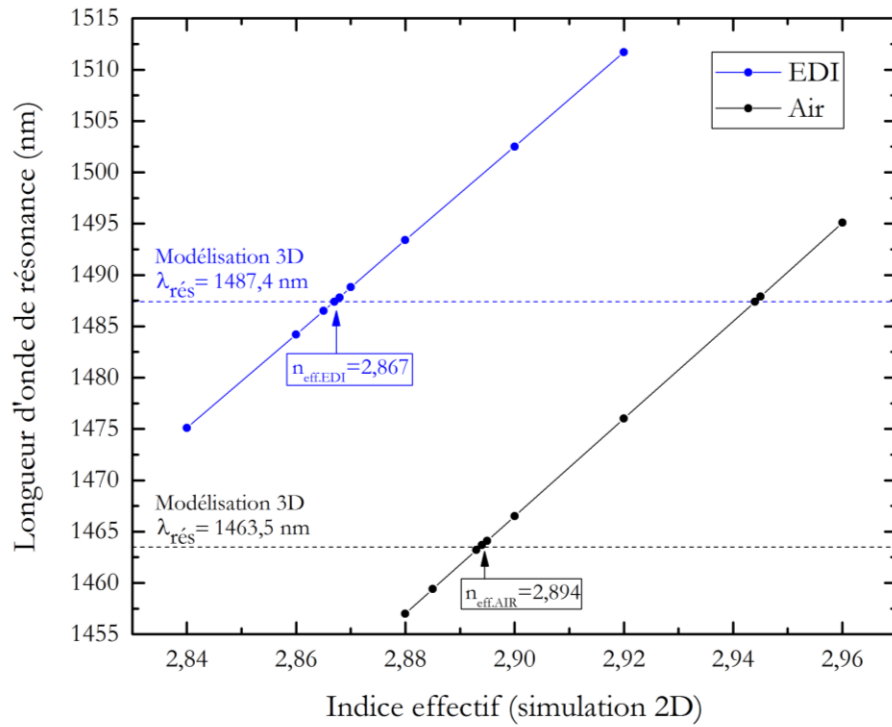


Fig. II.2 – Détermination de l'indice effectif d'une microcavité CMT3 pour des calculs 2D. La courbe bleue représente la longueur d'onde de résonance de la structure immergée dans l'EDI en fonction de l'indice effectif de la structure. La courbe noire correspond à cette même structure immergée dans l'air. Les lignes horizontales représentent la longueur d'onde de la structure optique calculée à partir d'une modélisation 3D.

A. 1. b. Paramètres de calcul

Deux paramètres principaux influent sur la pertinence des calculs numériques (2D et 3D) : le temps de calcul (cT) et la taille du maillage (nm). Afin d'identifier des valeurs pertinentes pour ces deux paramètres pour le calcul 2D, nous les avons fait varier dans le cadre du calcul du facteur de qualité (Q) d'une microcavité CMT3. Il avait été préalablement calculé [ref 2] que le facteur de qualité d'une CMT3 est de 2400. Pour chacun des graphiques de la **Fig. II.3**, un paramètre a été fixé et le second varie. Pour le **Graphique a**, la taille du maillage est fixée à 10 nm et le temps de calcul varie de 0 à 30 000 cT. On observe que la valeur du facteur de qualité augmente puis se stabilise après 8000 cT. Le temps de calcul doit donc être d'au moins 8 000 cT pour un résultat pertinent. Pour le **Graphique b**, le temps de calcul est fixé à 15 000 cT. En faisant varier la taille du maillage de 10 nm à 100 nm on observe que plus le maillage est grand, moins le calcul est pertinent. On sélectionnera préférentiellement un maillage inférieur ou égal à 30 nm. Suivant les dimensions des phénomènes que l'on souhaite étudier il conviendra d'utiliser des tailles de maillage adaptées (10 nm pour étudier la distance d'interaction objet piégé-cavité par exemple). Sur chacun de ces graphiques est également représenté le temps de calcul (en minutes) requis sur notre ordinateur de calcul.

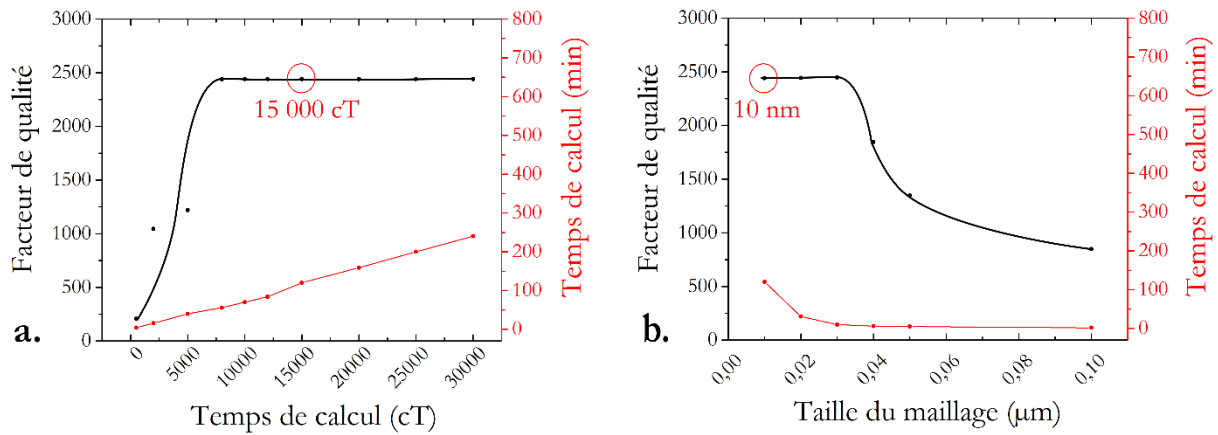


Fig. II.3 – Détermination des paramètres de calcul optimaux pour la simulation FDTD – Rosft Fullwave (calcul pour une microcavité CMT3). **a.** Influence du temps de calcul sur le calcul du facteur de qualité (taille de maillage fixée à 10 nm). **b.** Influence de la taille du maillage sur le calcul du facteur de qualité (temps de calcul fixé à 15 000 cT). En rouge est représenté le temps de calcul (en minutes) nécessaire pour réaliser ces simulations sur notre ordinateur de calcul.

Pour réaliser les calculs présentés par la suite nous avons donc sélectionné un **temps de calcul de 15 000 cT** et un **paramètre de maille de 10 nm**. Ces paramètres assurent un calcul pertinent pour un temps de calcul inférieur à 150 minutes.

A. 1. c. Design de microcavités

Les dimensions des microcavités ont été optimisées lors de travaux antérieurs [ref 2,3]. L'épaisseur des structures était alors de 340 nm afin de maximiser le confinement de la lumière. Nous désignerons les cotes de ces structures SOI 340 nm par le terme dimensions « nominales ». Les valeurs de ces cotes nominales sont disponibles en [annexe 1](#). Elles étaient principalement utilisées pour le piégeage et la manipulation de billes de polystyrène. Cette application requerrait une puissance minimum injectée dans la structure de plusieurs dizaines de mW (en sortie de fibre) afin d'obtenir des forces optiques de gradient suffisantes.

Lors de la manipulation d'objets biologiques, il est primordial de ne pas affecter leur viabilité par l'utilisation de puissances optiques trop importantes [ref 4,5]. Afin de conserver des forces optiques de gradient permettant le piégeage de bactéries, nous avons augmenté la partie évanescente du champ électromagnétique de la microcavité en réduisant l'épaisseur des structures optiques à 250 nm. Les paramètres influant sur la longueur d'onde de résonance des microcavités CMT sont représentés **Fig. II.4** : le diamètre (D), le nombre (N) et l'écart (L) entre les trous du miroir ainsi que la longueur de cavité C (distance entre les deux séries de trous). La hauteur et la largeur des structures sont fixées respectivement à 250 nm et 500 nm.

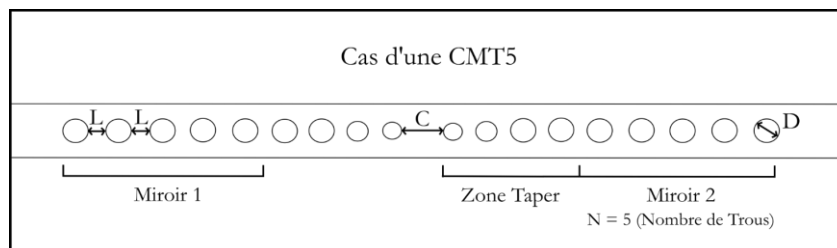


Fig. II.4 – Paramètres des structures CMT_N , cas d'une CMT5.

Afin d'évaluer l'impact de chacun de ces paramètres sur la longueur d'onde de résonance de la microcavité, nous avons réalisé un ensemble de simulations dont les résultats sont présentés **Fig. II.5**. Nous avons fait varier indépendamment le diamètre, l'écart entre les trous du miroir ainsi que la longueur de cavité d'une CMT3. Le nombre de trous des miroirs influence uniquement le facteur de qualité des structures, pas leur longueur d'onde de résonance. Les dimensions sont données par rapport à celles des structures dites nominales.

Ces calculs permettent de décrire l'influence de chacun des paramètres. On observe **Fig. II.5** que les paramètres D et L ont une influence deux fois plus forte que le paramètre C. De manière plus précise : lorsque le diamètre des trous D augmente de 1 nm, la longueur d'onde de résonance augmente d'environ 2 nm. Lorsque la distance entre les trous L augmente de 1 nm, la longueur d'onde de résonance augmente d'environ 2 nm. Lorsque la longueur de cavité C augmente de 1 nm, la longueur d'onde de résonance augmente de 1 nm.

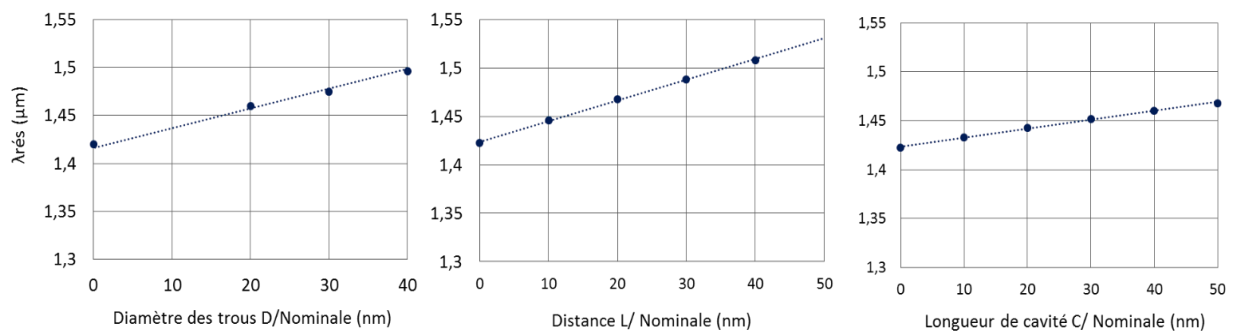


Fig. II.5 – Variation de la longueur d'onde de résonance d'une cavité CMT3 en fonction du diamètre des trous D (a), de la distance inter-trous L (b), et de la longueur de la cavité L (c). Les valeurs de D, L et C sont données par rapport aux dimensions des structures dites « Nominales » en référence aux anciennes structures (SOI 340 nm).

A partir de ces résultats, nous avons calculé les cotes optimales des structures de piégeage SOI 250 nm. Nous avons choisi d'augmenter de 30 nm la distance inter-trous L par rapport aux cotes nominales ([annexe 1](#)). Ces cotes optimales nous permettent de travailler dans la zone de fonctionnement de notre source laser, c'est-à-dire autour de 1,5 μm .

A. 2. Cartographie de champ

Les calculs de cartographie du champ des microcavités ont été réalisés en utilisant des modélisations 2D et 3D. En injectant sa longueur d'onde de résonance dans une structure optique, il est possible de calculer la répartition du champ électromagnétique à l'intérieur mais également d'imager la partie évanescente de ce champ. Le placement libre de détecteurs permet d'imager la totalité du champ ou d'effectuer des vues en coupe.

A. 2. a. Cartographie 2D

Le champ a été cartographié en milieu de structure, selon l'axe x (**Fig. II.6a**). On observe sur les **Fig. II.6b-c** la répartition de la densité d'énergie du champ par rapport à la géométrie de la microcavité (**Fig. II.6d**). Ces calculs ont été réalisés pour un environnement d'indice 1,33 (EDI, **Fig. II.6b**) et d'indice 1,00 (Air, **Fig. II.6c**).

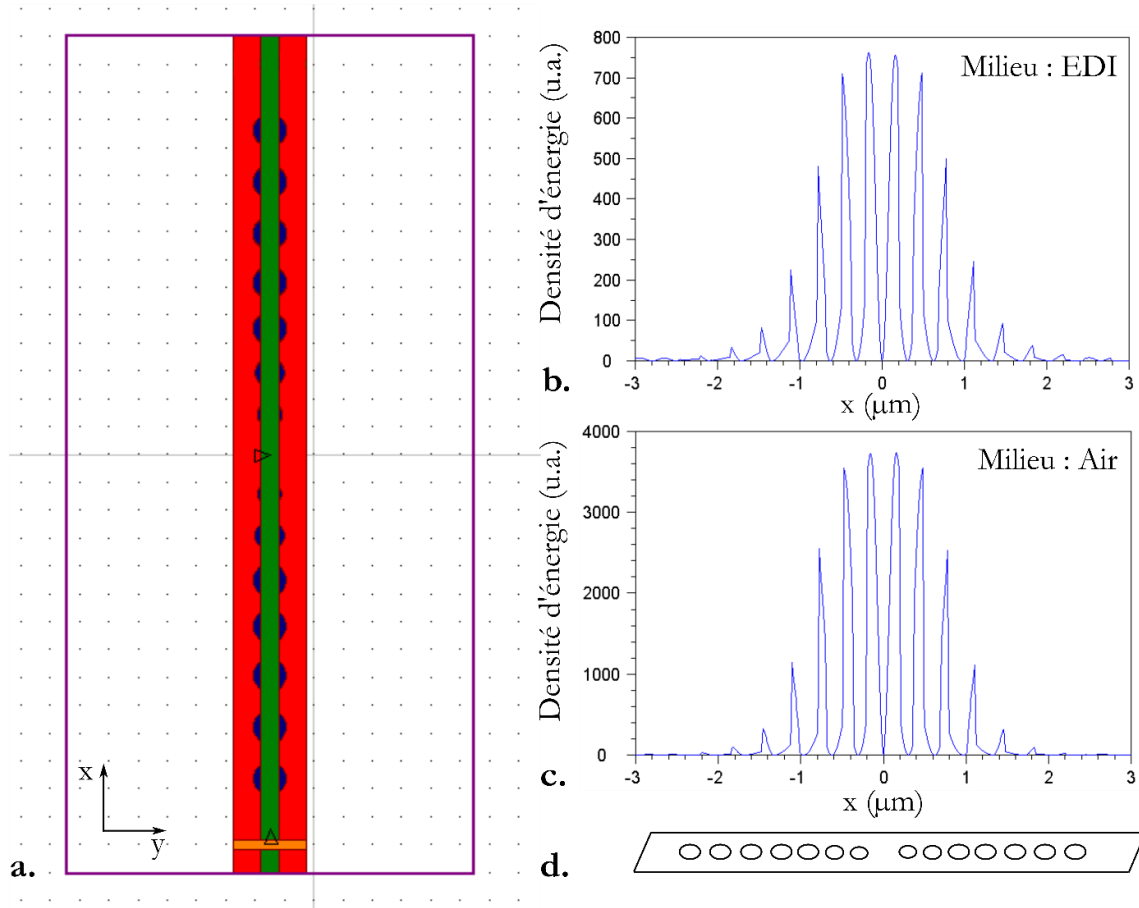


Fig. II.6 – a. Représentation 2D d’une structure CMT3. La source de lumière est représentée en jaune, le détecteur utilisé pour la cartographie de champ des figures **b** et **c** est représenté en vert. Modélisation 2D de la répartition de la densité d’énergie du champ électromagnétique au sein d’une structure CMT3 dans l’EDI (**b**) et dans l’air (**c**). **d**. Représentation à l’échelle de la géométrie de la structure alignée avec les cartographies des figures **b** et **c**. Les paramètres de calculs sont un temps de calcul de 15000 cT et un maillage de 10 nm.

Nous observons que dans les deux cas la répartition de champ est la même, avec une densité d’énergie cinq fois plus importante lorsque la microcavité se trouve dans l’air. Le champ est principalement localisé dans la zone à taper du cristal photonique 1D avec un maximum de champ au centre de la microcavité. On peut considérer en analysant les cartographies **Fig. II.6b-c** que le champ s’étend le long de l’axe de la structure optique principalement sur une zone de $2\ \mu\text{m}$ centrée sur la cavité. Nous avons ici montré la modélisation 2D du champ des cristaux photoniques 1D, le paragraphe suivant concerne leur caractérisation 3D.

A. 2. b. Cartographie 3D

La modélisation 3D donne accès à une modélisation plus précise et plus complète des structures optiques étudiées. Elle permet notamment de calculer la répartition de champ dans les structures à cristaux photoniques 1D en faisant varier le paramètre d’épaisseur de la structure (250 nm ou 340 nm) de manière plus précise qu’en effectuant un calcul 2D avec un indice effectif.

La **Fig. II.7a** représente la modélisation d’une structure silicium CMT3 sur un morceau de silice. Le détecteur centré sur la cavité permet de cartographier le champ dans cette région. C’est cette configuration qui a été utilisée pour cartographier le champ de la **Fig. II.8** pour du SOI 250 nm et 340 nm dans l’air et dans l’EDI.

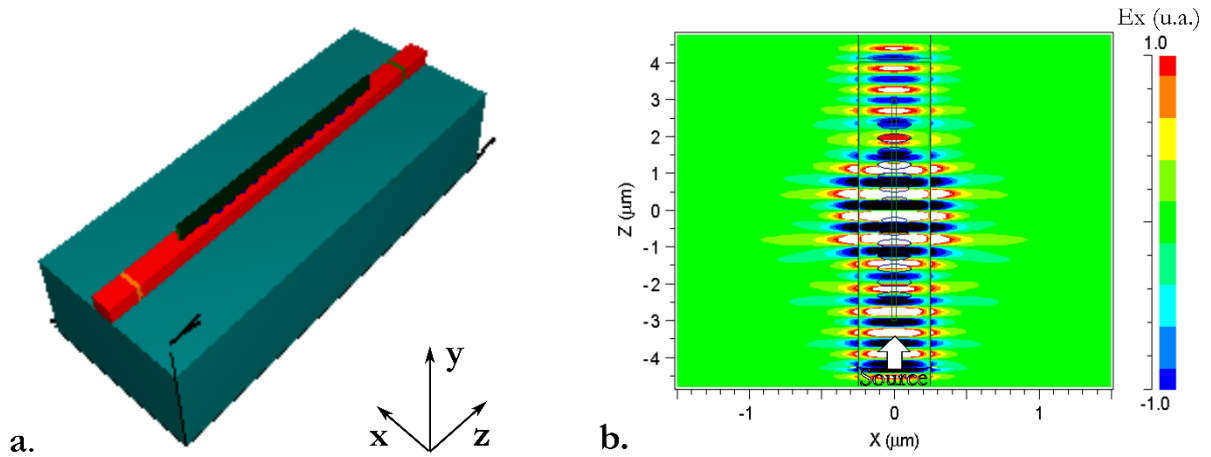


Fig. II.7 – a. Modélisation 3D d’une structure CMT3. La source de lumière est représentée en jaune et les détecteurs en vert. Le silicium est en rouge et la silice en rouge. b. Cartographie de répartition du champ (densité d’énergie) dans une structure CMT3 dans un milieu d’indice 1,33 (eau), vue de dessus.

On observe **Fig. II.7b** que la cartographie de champ 3D est cohérente avec la cartographie de champ 2D et présente quatre maxima de champ centrés sur $2\ \mu\text{m}$ (axe z) autour du centre de la cavité. C’est sur cette zone qu’est concentrée la part la plus importante du champ dans le cristal photonique et c’est donc cette partie que nous avons choisie de représenter dans la **Fig. II.8**.

La première observation que l’on peut faire sur la **Fig. II.8** est liée à l’indice du milieu qui entoure la structure optique. Si l’on compare les figures **Fig. II.8a** et **Fig. II.8b** ou bien **Fig. II.8c** et **Fig. II.8d** on observe que la partie évanescente du champ est légèrement plus importante dans l’eau que dans l’air. Ce phénomène est dû au fait que la différence d’indice entre le milieu (1,00 ou 1,33) et le silicium (3,34) est plus importante pour l’air. On a donc un meilleur confinement de la lumière dans la structure optique et une moins grande délocalisation de la lumière autour de la cavité.

La seconde observation que l’on peut faire concerne l’épaisseur de la structure optique. A milieu extérieur équivalent on peut voir sur les différentes cartographies de la **Fig. II.8** que la part de champ évanescent est plus importante sur les structures en SOI 250 nm que sur celles en SOI 340 nm. Ces résultats valident donc notre objectif d’adapter les structures optiques au piégeage de bactéries en maximisant la part de champ évanescent.

On peut également interpréter les valeurs de champ qui sont indiquées sur l’échelle de couleur de chaque cartographie **Fig. II.8**. Elles sont assez similaires dans l’EDI quelle que soit l’épaisseur de la structure (**Fig. II.8b** et **Fig. II.8d**). Le champ est plus intense dans l’air (**Fig. II.8a** et **Fig. II.8c**) que dans l’EDI (**Fig. II.8b** et **Fig. II.8d**) du fait du confinement plus important du champ dans la structure optique (moins de pertes). Le champ est également plus intense dans la structure SOI 340 nm dans l’air (**Fig. II.8c**) que dans son homologue SOI 250 nm (**Fig. II.8a**), dû également au confinement plus important de la lumière dans les structures SOI 340 nm que dans les SOI 250 nm.

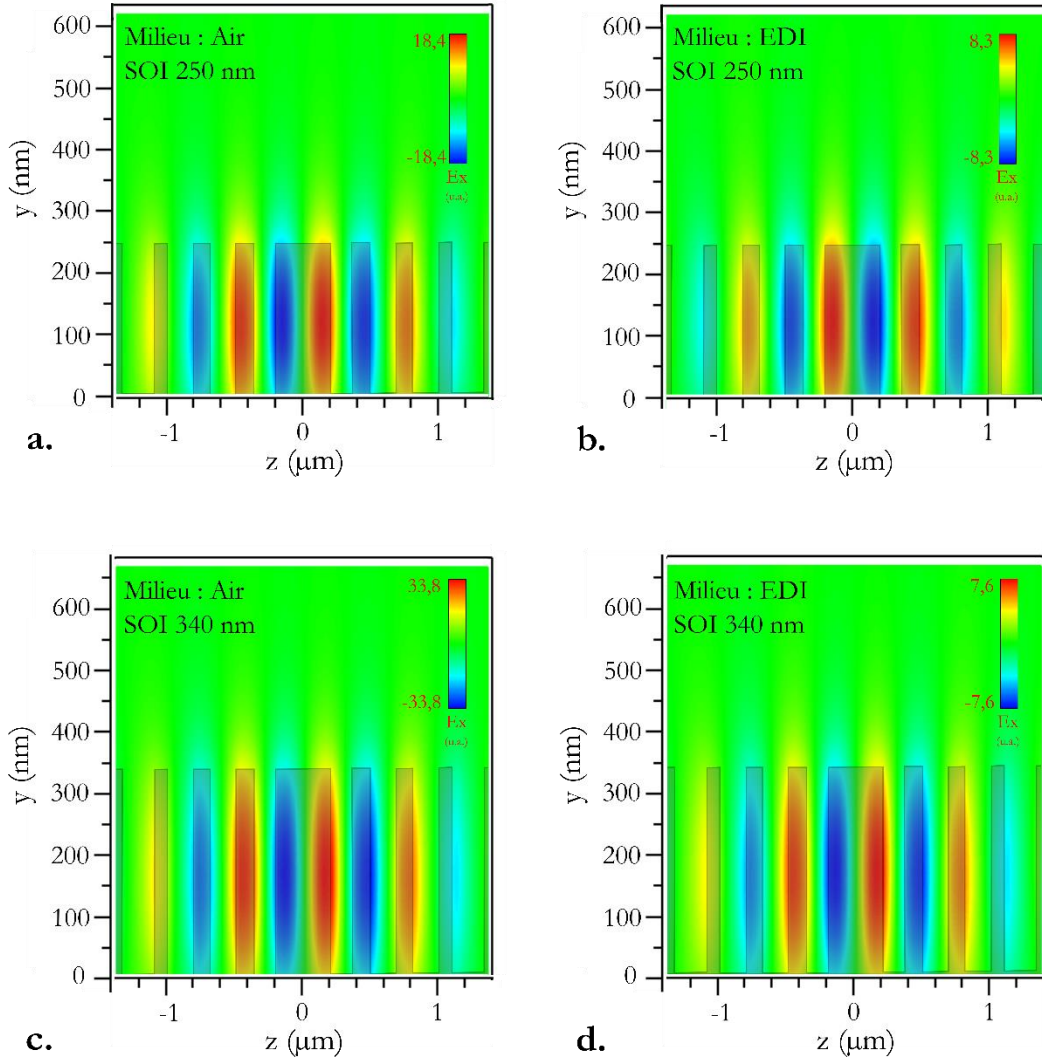


Fig. II.8 – Cartographies de champ d’une cavité CMT3, modélisation 3D. Vue en coupe de la structure optique, détecteur centré (**Fig. II.7a**). La structure silicium est représentée en gris clair à l’échelle. L’échelle de couleurs du champ E_x (u. a.) est également représentée sur chaque figure. **a.** Cavité SOI 250 nm dans un milieu d’indice 1,00 (Air). **b.** Cavité SOI 250 nm dans un milieu d’indice 1,33 (EDI). **c.** Cavité SOI 340 nm dans un milieu d’indice 1,00 (Air). **d.** Cavité SOI 340 nm dans un milieu d’indice 1,33 (EDI).

Finalement ces calculs de cartographie de champ ont permis de montrer que plus le confinement est important dans les structures, plus le champ est intense. Ce confinement est plus important quand la structure est dans l’air que quand elle est dans l’eau. Il l’est également pour des structures en SOI 340 nm plus que pour du SOI 250 nm. Nous avons également montré que moins le champ est confiné, plus la part de champ évanescent est importante, ce qui favorise le piégeage.

A. 3. Conclusion

Les calculs FDTD 2D et 3D ont permis de déterminer les cotes optimales des microcavités CMT_N en SOI 250 nm et de cartographier la répartition du champ électromagnétique dans ces structures. Ces calculs fournissent des informations de première importance pour la compréhension complète du fonctionnement des structures et pour leur optimisation. Par la suite, d’autres calculs numériques (3D) permettront de modéliser l’interaction d’une bactérie avec la partie évanescente du champ des cristaux photoniques 1D.

B) Fabrication

B. 1. Cristaux photoniques 1D

Les cristaux 1D sont réalisés sur wafer SOI (250nm/2µm/700µm). Après dépôt d'une résine négative (NEB22) en surface, le motif est réalisé par lithographie e-beam sur ces morceaux de SOI. Cette résine est ensuite développée (MF21A) puis le silicium est gravé selon les motifs souhaités par plasma à l'aide de gaz fluorés. Enfin, un plasma O₂ permet de nettoyer la résine en surface et d'éventuels résidus. Ce procédé de fabrication est illustré **Fig. II.9**.

Comme l'injection de lumière infrarouge dans la structure se fait par la tranche grâce au guide d'onde, l'échantillon est ensuite clivé de chaque côté afin de libérer les guides.

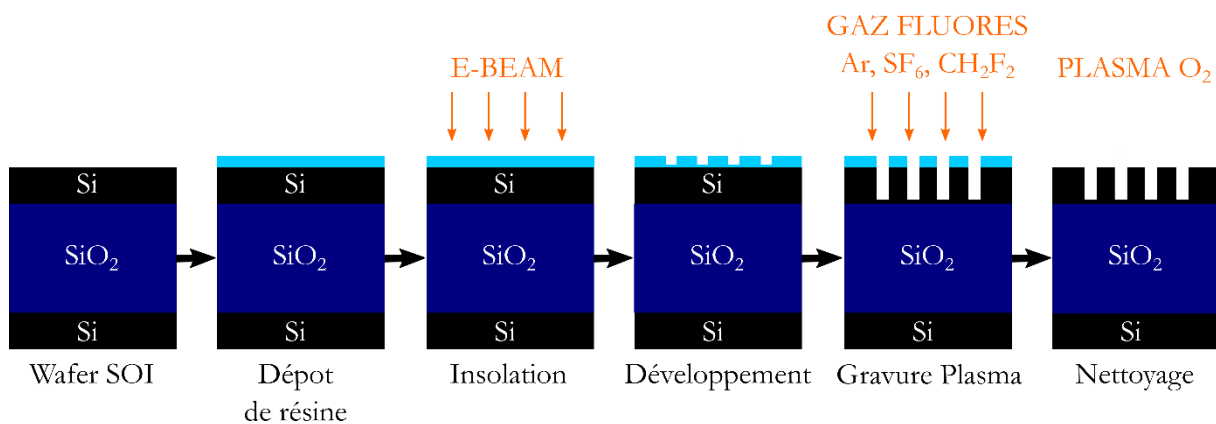


Fig. II.9 – Procédé de fabrication des cristaux photoniques 1D à cavité CMT sur support SOI.

B. 2. Cristaux photoniques 2D

Le détail des étapes de fabrication des cristaux photoniques bidimensionnels est illustré **Fig. II.10**. Les cavités creuses sont réalisées sur wafers SOI (220nm/2µm/750µm) préalablement découpés en morceaux. L'échantillon est poli mécaniquement afin d'amincir le substrat à 250 µm. Cette première étape permet de favoriser le clivage. Après nettoyage, une couche de résine positive (ZEP 50%) est déposée sur l'échantillon avant insolation e-beam des motifs. Le développement se fait ensuite avec une solution d'Amyl-Acétate, réaction stoppée par un bain de Méthyl-isobutyl-kétone (Mibk) et d'isopropanol. Une gravure Plasma permet ensuite de réaliser les motifs dans le silicium (SF₆, C₄F₈).

Après le clivage de la puce pour libérer l'entrée des structures, les cristaux photoniques sont ensuite suspendus par réaction entre l'acide fluorhydrique et le SiO₂. Une couche de résine est à nouveau déposée sur l'échantillon (AZ 5214) afin de préserver les guides d'ondes et les facettes de l'échantillon (cire de protection). Des ouvertures sont ensuite réalisées sur la couche de résine au niveau du cristal photonique afin de laisser passer le HF et suspendre les structures (membrane). La résine et la cire sont ensuite nettoyées en surface de l'échantillon grâce à un bain d'acétone. Un rapide passage dans l'isopropanol permet de rincer l'échantillon avant séchage avec vapeurs d'isopropanol.

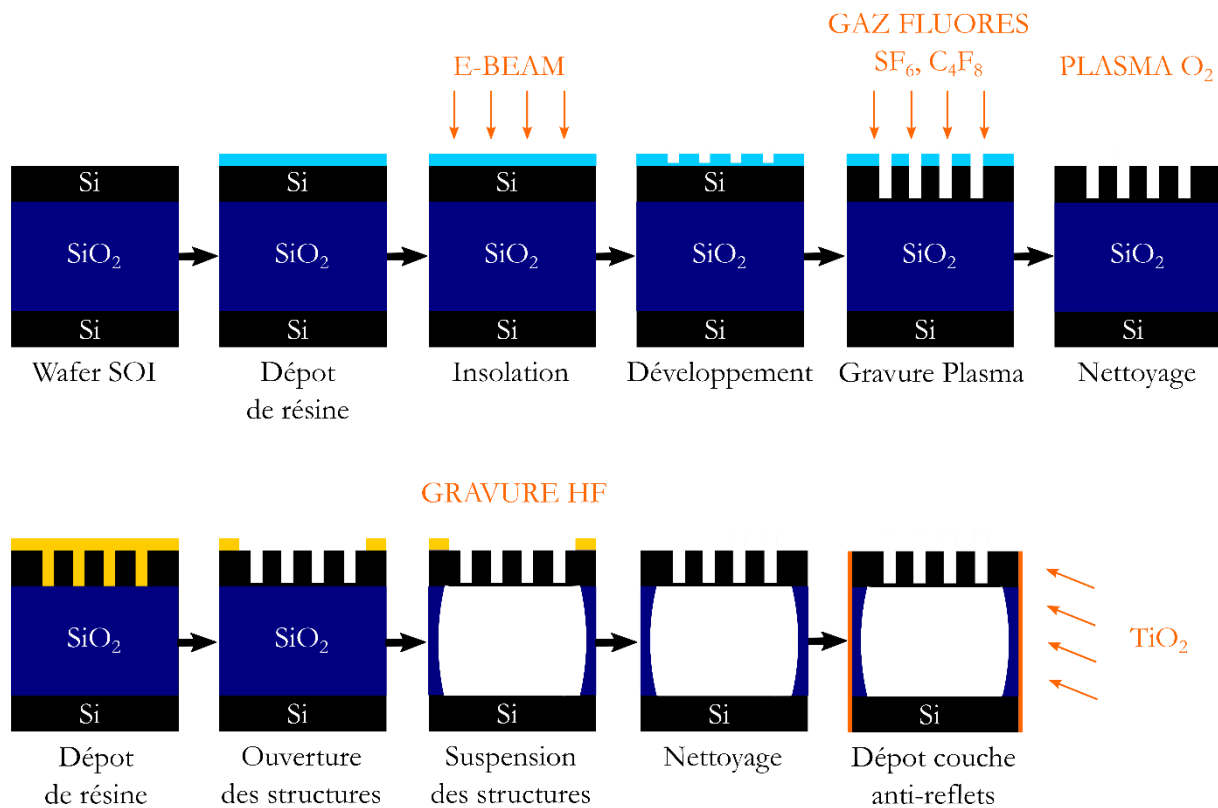


Fig. II.10 – Procédé de fabrication des cristaux photoniques 2D à cavité creuse sur support SOI.

La dernière étape de ce procédé de fabrication consiste à déposer une couche anti-réfléchissante sur les faces clivées de l'échantillon. Le matériau déposé est composé de 40% de TiO₂ mélangé avec 60% de SiO₂. Il permet de diminuer la réflexion de la lumière sur les faces clivées et donc de s'affranchir d'oscillations Fabry-Pérot dans le signal optique transmis par la structure.

B.3. Conclusion

La fabrication des structures à cristaux photoniques 1D a été réalisée au sein des laboratoires du CEA/LETI et CEA-CNRS Grenoble (Plateforme des Technologies Amont (PTA)). Les cristaux photoniques 2D ont été réalisés au sein de l'Institut de Physique de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Suisse [ref 6]. Ces structures optiques sont réalisées sur des pièces de SOI sur lesquelles sont regroupées quelques dizaines de structures. Cet ensemble est désigné par le terme « puce photonique ». Les caractéristiques des cristaux photoniques 1D et 2D désignés et fabriqués selon les méthodes décrites dans ce chapitre seront étudiées au **Chapitre III**.

C) Microfluidique

Les objets que nous souhaitons manipuler sont des bactéries en suspension dans différents milieux liquides. Afin d'amener ces objets à proximité des résonateurs optiques des puces photoniques, nous avons choisi de travailler avec un système de fluidique dit « statique », c'est-à-dire n'ayant aucune liaison microfluidique vers l'extérieur. Un bassin est découpé dans du polydiméthylsiloxane (PDMS) puis déposé sur la puce sur laquelle sont gravées les structures optiques. L'épaisseur du bassin est de 100 μm . C'est la dimension minimale qui permet une robustesse suffisante pour le manipuler avec une pince et le positionner sur la puce photonique. Dans ce bassin est déposée une goutte de solution de bactéries en suspension ($\approx 1 \mu\text{L}$) recouverte ensuite d'une fine lamelle de verre. Cette dernière favorise la visualisation des objets et empêche l'évaporation. L'ensemble puce photonique-système microfluidique forme une puce optofluidique, représentée **Fig. II.11**.

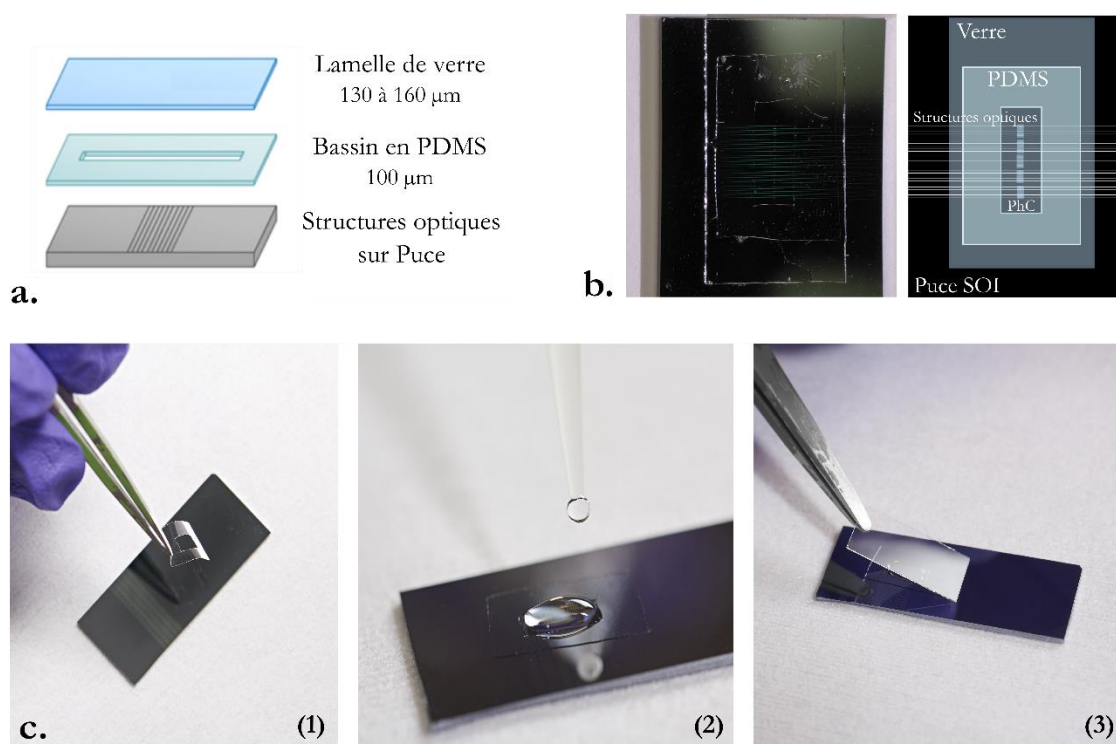


Fig. II.11 – **a.** Schéma de principe de la puce optofluidique. Les dimensions globales de ces puces optofluidiques sont déterminées par la puce optique dont les dimensions sont 1 x 3 cm. **b.** Photo et détail schématisé d'une puce optofluidique (« PhC » désigne les cristaux photoniques). **c.** Photos des étapes de montage : **(1)** dépose du bassin, **(2)** remplissage et **(3)** scellement de la puce optofluidique.

Le choix d'un système statique a été motivé par sa simplicité d'exécution et sa réversibilité. Utiliser un système dynamique nécessite en effet d'injecter des liquides à des pressions telles qu'il devient nécessaire de faire adhérer les composants entre eux (silicium, PDMS, verre). Durant ma thèse, étant limitée en nombre de puces photoniques, le développement de puces fluidiques dynamique a été écarté. Ces puces optofluidiques sont au cœur d'un dispositif permettant leur utilisation pour le piégeage et l'analyse des objets piégés. Ce dispositif expérimental est décrit au paragraphe suivant.

D) Montage

Au cours des thèses qui ont précédé la mienne un dispositif dédié à l'optique intégrée et à l'observation en microscopie de fluorescence a été développé [ref 2,7,8]. Il était adapté au piégeage et à la caractérisation de billes de polystyrènes fluorescentes de taille micronique sur cristaux photoniques 1D en SOI 340 nm. J'ai choisi de décrire ce montage initial avant de montrer les modifications apportées pour l'adapter au piégeage d'objets biologiques.

D. 1. Montage préexistant

Le banc d'optique (**Fig. II.12**) était équipé d'une source laser accordable en longueur d'onde entre 1450 nm et 1590 nm (Tunics, Yenista Optics). La puissance délivrée par cette source est comprise entre 0,2 mW et 15 mW avec un maximum en milieu de gamme (1530-1550 nm). Un amplificateur à fibre dopée (ions erbium, EDFA) permettait d'obtenir jusqu'à 225 mW dans la gamme de longueurs d'onde 1529-1590 nm. Le signal laser était guidé jusqu'à la puce photonique par une fibre à maintien de polarisation. Il était ensuite injecté dans la structure optique en silicium par sa face clivée grâce à l'extrémité lentillée de la fibre. Cette dernière, taillée en pointe par polissage à 45°, permet de focaliser la lumière sur le guide d'onde d'une unique structure optique.

Deux dispositifs permettaient d'analyser l'action des structures de piégeage. Le premier est un système de collection du signal transmis par la structure optique. Il est composé d'un objectif Cassegrain (grossissement 15x), suivi d'un polariseur qui permet de sélectionner le mode unique de nos structures optiques. Le signal est ensuite détecté par une photodiode InGaAs, puis amplifié et affiché sur un oscilloscope numérique. Le second est un système de visualisation. Une colonne de vision commerciale (12x Ultrazoom Navitar) est surmontée d'une caméra CCD N&B (Prosilica GC 1290, AVT). Elle permet d'imager les structures optiques et les microbilles fluorescentes au travers d'un objectif Mitutoyo 50x (M Plan APO HR). Suivant les applications il est possible de travailler avec une source de lumière halogène (blanche) ou avec une diode (bleue - 475 nm).

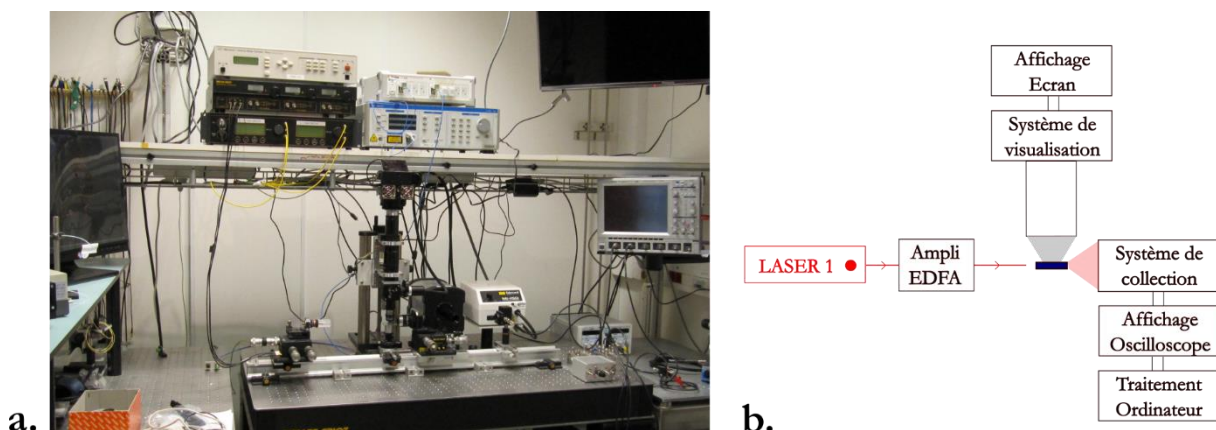


Fig. II.12 – Montage expérimental préexistant photo (a) et schéma (b).

D. 2. Montage développé

Le montage précédemment décrit a été modifié afin de répondre aux contraintes imposées par la manipulation d'objets biologiques principalement non-fluorescents. Ces contraintes sont les suivantes :

- ❏ **Faible contraste d'indice entre les bactéries et l'eau.** Nous cherchons à observer des d'objets dont l'indice optique ($1,365 - 1,422$ [ref 9,10 et Chapitre IV]) est proche de celui du milieu dans lesquels ils se trouvent en suspension ($1,33$).
- ❏ **Importance de la température.** Les bactéries sont sensibles à ce paramètre [ref 11-13], il est important de pouvoir sélectionner précisément la valeur de la température de l'environnement dans lequel elles évoluent.
- ❏ **Faible puissance de piégeage.** Les objets biologiques sont fragiles, la puissance de piégeage doit être réduite pour ne pas les endommager [ref 4,5]. Nous ne pouvons pas utiliser l'amplificateur et devons travailler à une puissance injectée maximale de 15 mW. La puissance injectée doit cependant être suffisante pour piéger les objets. Le fait de travailler à faible puissance nous contraint à optimiser les conditions de couplage de la lumière dans la structure optique afin de limiter les pertes et d'injecter suffisamment de puissance pour piéger ces objets biologiques.

D. 2. a. Système de visualisation

Nous avons choisi d'utiliser un objectif multi-lamelles. (Olympus, 40x). Cet objectif possède une bague de compensation qui permet de s'affranchir des aberrations sphériques en prenant en compte l'épaisseur de la lamelle de verre ainsi que l'épaisseur de liquide de la chambre fluidique (jusqu'à 2 mm). Nous avons également remplacé la caméra CCD par un appareil photo (Sony $\alpha 7S$) qui permet de prendre jusqu'à 60 images par seconde des abords de la structure optique, affichées en direct sur un écran situé au-dessus du banc optique. Le capteur de cet appareil photo est refroidi ($4-7^{\circ}\text{C}$) afin de maximiser la qualité des images.

Si les bactéries sont naturellement non-fluorescentes, nous avons également travaillé avec certaines bactéries *E. coli* modifiées génétiquement pour présenter cette fluorescence. Comme pour les billes de polystyrène précédemment étudiées elles présentent une fluorescence de couleur verte (émission autour de 504 nm), dont l'un des maxima d'excitation se trouve dans le bleu (autour de 475 nm).

La source d'éclairage à utiliser est une diode bleue filtrée à 475 nm. Elle éclaire les objets en suspension dans de l'eau qui sont imagés en réflexion. Un miroir dichroïque permet d'éclairer les objets dans le bleu et filtre cette lumière bleue sur le chemin optique vers le détecteur. Il comporte un filtre vert pour ne sélectionner que la fluorescence émise par les objets. Dans cette configuration, il était impossible de visualiser à la fois les structures optiques et les bactéries (ou les billes). Nous avons donc confectionné un système d'éclairage en lumière rasante (LED blanches ou bleues) afin de visualiser les contours des structures optiques lorsque nous observons les bactéries (ou les billes) en fluorescence (**Fig. II.13**).

Le fait de travailler avec des bactéries fluorescentes est un atout lorsque l'on souhaite étudier leur déplacement et tracer leurs trajectoires. Cela nous permet de mieux discerner leur contour lorsqu'elles se trouvent dans le piège. Cela est particulièrement avantageux pour les bactéries de petite taille lorsqu'elles s'alignent sur la cavité lors du piégeage (*E. coli*).

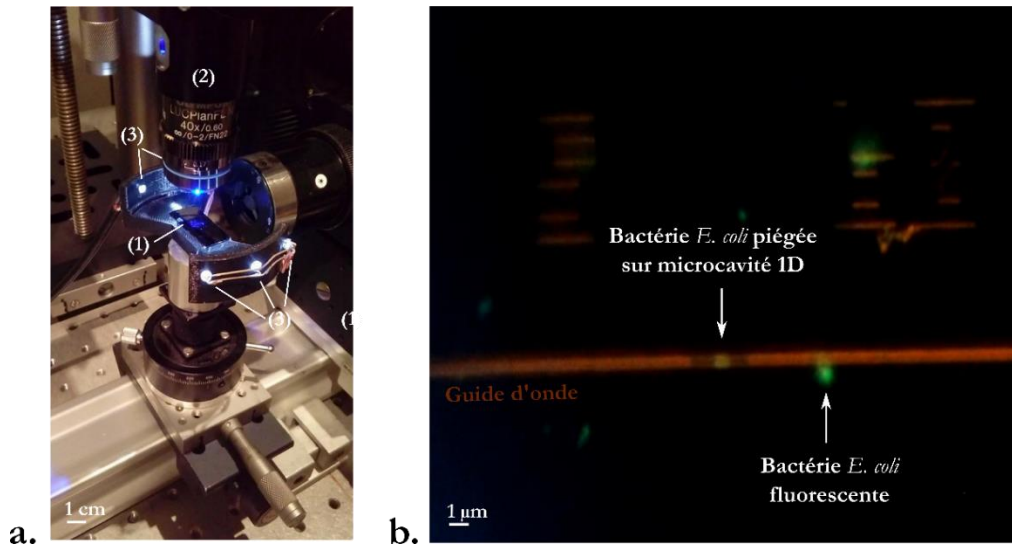


Fig. II.13 – **a.** Module de fluorescence. L'échantillon (1) est soumis à l'éclairage bleu de la colonne de visualisation (2) et les structures optiques sont visualisées grâce à l'éclairage rasant délivré par 5 LED blanches ou bleues(3). **b.** Images obtenues grâce au développement du module de fluorescence. Bactéries *E. coli* fluorescentes en vert et guide d'onde et microcavité en orange.

Ce système d'éclairage est directement intégré au porte échantillon (**Fig. II.13a**). Il est utilisé dans le cas où nous travaillons avec des objets fluorescents. Dans le cas contraire nous avons construit un deuxième porte échantillon régulé en température.

D. 2. b. Porte échantillon régulé en température

Nous avons construit un porte échantillon auquel nous avons intégré un élément Peltier qui permet de maintenir l'échantillon à des températures comprises entre 10°C et 50°C. Ce porte échantillon est représenté **Fig. II.14**.

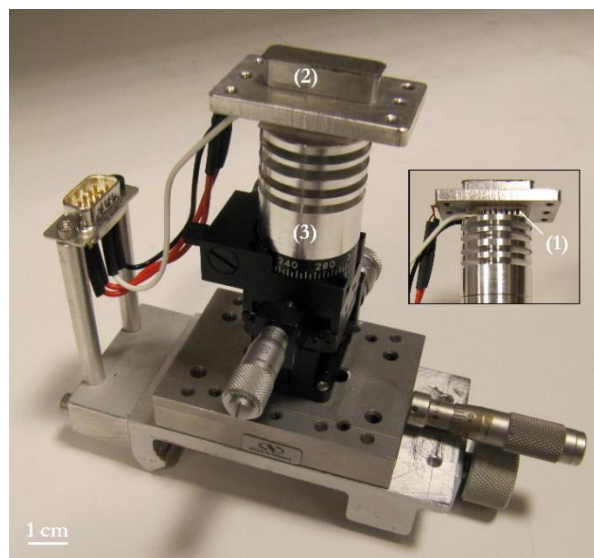


Fig. II.14 – Module Peltier. Un système Peltier (1) permet d'amener la température de l'échantillon de 10°C à 50°C. L'échantillon est placé sur la pièce d'aluminium supérieure (2) dont la température est monitorée en temps réel. L'excédent de chaleur est évacué par une pièce d'aluminium faisant office de radiateur (3).

L'élément Peltier est monté sur une platine trois axes entre deux pièces d'aluminium. La pièce supérieure assure le lien thermique avec l'échantillon (le transfert est optimisé par du scotch double-face conducteur thermique). La pièce inférieure est usinée de manière à optimiser l'évacuation de la chaleur (radiateur). Il est primordial d'optimiser la régulation en température de l'échantillon car nous souhaitons étudier les bactéries à leur température de croissance optimale. Nous souhaitons réguler la température à 0,1°C près et sans dépassement. Nous utilisons pour cela un régulateur PID (action proportionnelle, intégrale, dérivée) dont les paramètres sont le gain, l'action intégrale et l'action dérivée. Un thermocouple noyé dans la pièce d'aluminium supérieure (colle conductrice) permet l'asservissement du système. Nous avons d'abord optimisé la valeur du gain afin d'avoir un temps de réponse rapide (< 1 minute) ($G = 1,5$), puis choisi une valeur faible pour l'action intégrale afin de limiter le dépassement à la consigne ($I = 0,002$). L'action dérivée fait diminuer le dépassement sans réduire le temps de réponse, nous l'avons fixé à 0,8.

D. 2. c. Optimisation des conditions de couplage

Nous avons intégré un contrôleur de polarisation à boucles de Lefevre sur le chemin optique du dispositif d'injection de la lumière dans les structures optiques. Ce composant non-dissipatif permet de modifier la polarisation de la lumière sans perte d'intensité. Il nous permet ici de sélectionner le mode de polarisation $TE_{0,0}$ de nos structures monomodes.

Le contrôle de la polarisation de la lumière injectée a permis d'augmenter la stabilité du couplage. Cela nous permet de réaliser des couplages sur plusieurs minutes sans avoir besoin de retoucher la position de la fibre d'injection.

Un dispositif CT400 (Yenista Optics) a également été implémenté. Relié à la fois à la source laser et au photodétecteur, il permet d'enregistrer le signal transmis par la structure optique en fonction de la longueur d'onde exacte délivrée par la source.

D. 2. d. Dispositif à deux lasers

Un second Laser accordable entre 1440 nm et 1640 nm (Tunics, Yenista Optics) a été implémenté. Le signal laser des deux sources est couplé dans un système fibré 2 x 1 (50:50) dont la polarisation est contrôlée par des boucles de Lefevre. L'injection est toujours réalisée grâce à une fibre lentillée.

Le montage expérimental est utilisé dans deux configurations. La première consiste à n'utiliser qu'une seule source laser. Elle permet l'étude de la signature optique du piégeage, propre à la bactérie piégée. La seconde configuration consiste à utiliser les deux sources laser et permet d'étudier l'indice optique de l'objet piégé et le recouvrement champ électromagnétique-bactérie. Ces deux configurations sont représentées **Fig. II.15** et seront détaillées dans les **Chapitres V et VI**.

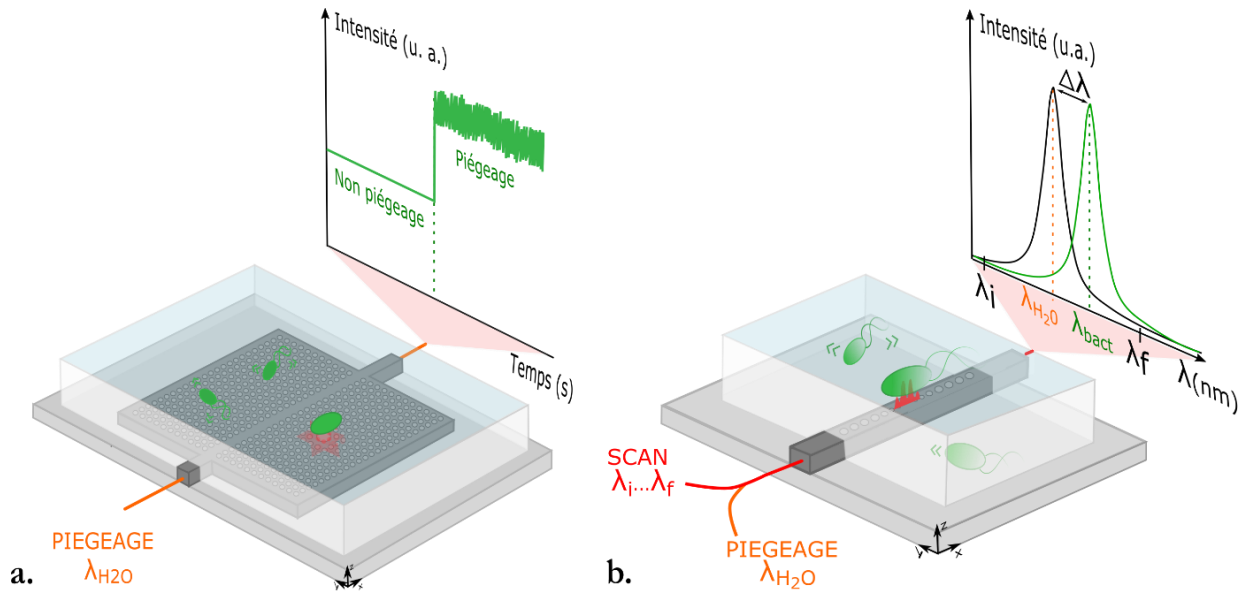


Fig. II.15 – Deux configurations optiques permettant d’identifier une bactérie piégée (Configuration à un laser **(a)**) ou son état (Configuration à deux lasers **(b)**). Ces deux configurations peuvent être utilisées avec des cristaux photoniques 1D et 2D.

D. 2. e. Montage expérimental final

Le montage expérimental développé durant ma thèse à partir de celui développé durant les thèses précédentes est représenté **Fig. II.16**.

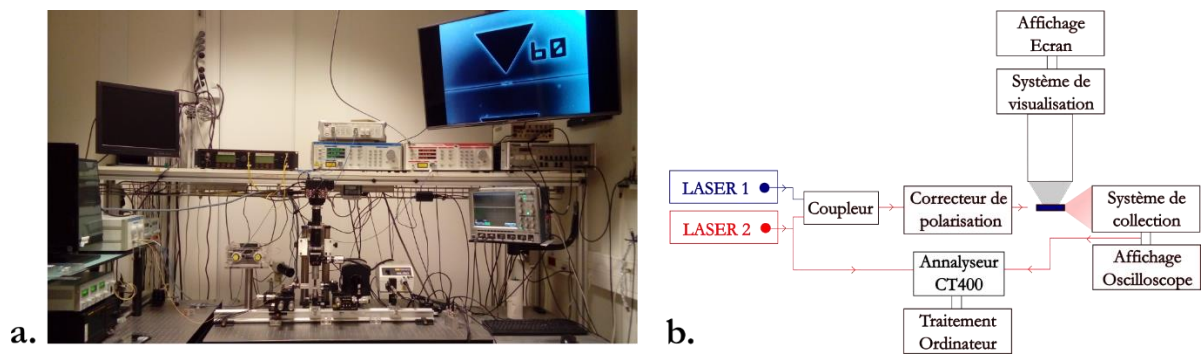


Fig. II.16 – Montage optique photo **(a)** et schéma **(b)** développé pendant la thèse à partir du montage préexistant présenté **Fig. II.12**.

Les développements présentés ont permis d'adapter le dispositif existant au piégeage d'objets biologiques. Ils ont également amélioré la stabilité des couplages (polarisation, porte échantillon) et la précision de l'analyse (CT400). L'ensemble de ces éléments a contribué à l'optimisation des temps caractéristiques de la manipulation expérimentale, ouvrant de nouvelles possibilités d'étude. Le suivi de l'état bactérien développé au Chapitre VI a par exemple nécessité la réalisation de 20 piégeages indépendants par tranche horaire de 20 minutes pendant plus de 3h.

Cette étude n'aurait pas été réalisable sans l'optimisation du dispositif expérimental présenté dans cette partie. L'ensemble des développements présenté a été réalisé tout au long du projet de thèse. Ils ont été implémentés en grande partie dès le début du projet (visualisation, stabilité des couplages), mais certains ont vu le jour par la suite avec l'évolution de nos besoins comme c'est le cas pour le dispositif à deux lasers. En fin de thèse, nous avons également travaillé à l'intégration de ce dispositif, favorisant la stabilité des couplages (**Chapitre VI**).

F) Conclusion

Les modifications apportées au dispositif expérimental au cours de cette thèse ont permis son évolution vers le piégeage de suspensions colloïdales issues du vivant telles que les bactéries. Une première étude de simulation numérique a permis de calculer les dimensions optimales des structures de piégeage. La réduction de leur épaisseur entraîne une part plus importante de champ évanescent, permettant le piégeage de bactéries à faible puissance injectée (15 mW). Le choix d'un système de microfluidique statique permettant d'amener les bactéries à proximité des cristaux photoniques a été motivé par sa simplicité d'utilisation et sa réversibilité. Le système d'imagerie a été optimisé afin d'obtenir des films de piégeage d'une qualité suffisante pour détecter la position des bactéries et calculer leur trajectoire. Cette caractérisation spatiale sera présentée au **Chapitre III**. De même le couplage de la lumière dans les structures optiques ainsi que la mise en place d'un dispositif à deux lasers a permis le développement d'une caractérisation temporelle du piégeage optimisée, également présentée au chapitre suivant.

Références :

- [1] *The Finite Difference Time Domain Method for Electromagnetics*. K. S. Kunz, R. J. Luebbers, CRC Press (1993).
- [2] *Ingénierie de mode en optique intégrée sur silicium sur isolant*. P. Velha, Université Paris Sud - Paris XI (2008).
- Matériaux artificiels : ingénierie de dispersion des micro-ondes à l'optique*. O. Vanbesien, Lavoisier (2012).
- [3] *Ultra-High Q/V Fabry-Perot microcavity on SOI substrate*. P. Velha, E. Picard, T. Charvolin, E. Hadji, J. C. Rodier, P. Lalanne, and D. Peyrade, *Optics Express* **15**, 24 (2007).
- [4] *Optical Tweezers Cause Physiological Damage to Escherichia coli and Listeria Bacteria*. M. B. Rasmussen, L. B. Oddershede, and H. Siegmundfeldt, *Applied And Environmental Microbiology* **74**, 8, 2441–2446 (2008).
- [5] *Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps*. K. C. Neuman, E. H. Chadd, G.F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block, *Biophysical Journal* **77**, 2856–2863 (1999).
- [6] *Piégeage optique résonant et analyse du mouvement de nanoparticules piégées dans des cristaux photoniques à cavités creuses*. M. L. H. TONIN, EPFL (2016).
- [7] *Nanopinces optiques sur puce pour la manipulation de particules diélectriques*. C. Renaut, Université de Bourgogne (2014).
- [8] *Piégeage et manipulation d'objets colloïdaux à l'aide de structures photoniques en silicium intégrées dans des puces optofluidiques*. C. Pin, Université de Bourgogne (2016).
- [9] *Refraction and absorption of light in bacterial suspensions*. J. B. Bateman, Jack Wagman, E. L. Carstensen, E.L. Kolloid-Z.u.Z.Polymer, 208, 44-58 (1966).
- [10] *An optofluidic imaging system to measure the biophysical signature of single waterborne bacteria*, P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, T. C. Ayi, P. H. Yap, T. Bourouina and Y. Leprince-Wang, *Lab Chip* **14**, 4237 (2014).
- [11] *The role of fever in the infected host*. J. D. Hasdaya, K. D. Fairchild, C. Shanholtz, *Microbes and Infection* **2**, 1891–1904 (2000).
- [12] *The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of Escherichia coli O157:H7*. R. L. Buchanan and L. A. Klawitter, *Food Microbiology* **9**, 185-196 (1992).
- [13] *Survival and Growth Characteristics of Escherichia coli Associated with Hemorrhagic Colitis*. M. P. Doyle, J. L. Schoeni, *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 855-856 (1984).

III. Méthodes d'analyse et caractérisation des structures optiques

A) Caractérisation spatiale

A. 1. État colloïdal et mouvement brownien

A. 1. a. Sédimentation

A. 1. b. Agitation thermique

A. 2. Protocole expérimental

A. 3. Analyse des trajectoires

A. 4. Conclusion

B) Caractérisation temporelle

B. 1. Concepts généraux

B. 1. a. Protocole expérimental

B. 1. b. Signaux transmis par les structures optiques

B. 1. c. Analyse des signaux optiques

B. 1. d. Conclusion

B. 2. Caractérisation expérimentale des résonateurs optiques

B. 2. a. Indice optique

B. 2. b. Température

C) Conclusion

Le développement des structures optiques et du dispositif de piégeage présentés au chapitre précédent est dédié au piégeage des bactéries. Ce chapitre présente les méthodes d'analyse que nous avons développées afin d'extraire de l'information de ce piégeage. Ce sont des outils de caractérisation spatiale et temporelle du piégeage. La caractérisation spatiale concerne l'analyse de la trajectoire des bactéries, piégées ou non, au travers du traitement des images du système de visualisation. La caractérisation temporelle repose sur l'analyse du signal transmis par les structures optiques (intensité). Elle concerne à la fois les structures en elles-mêmes mais également le piégeage de bactéries.

A) Caractérisation spatiale

La caractérisation spatiale est fondée sur l'analyse de la trajectoire des bactéries lorsqu'elles sont piégées ou non. Le faible facteur de qualité des structures que nous utilisons ($Q < 15\,000$) autorise un déplacement aux bactéries piégées. Ce déplacement est confiné mais reste caractéristique de la bactérie, comme nous le verrons par la suite au **Chapitre V**. Cette caractérisation spatiale repose sur l'utilisation du système de visualisation situé au-dessus de l'échantillon présenté **Chapitre II. Paragraphe D**. Avant de la présenter, nous allons introduire quelques éléments théoriques sur le déplacement des bactéries en suspension et sur son caractère brownien.

A. 1. État colloïdal et mouvement brownien

Dans un premier temps nous approximations les bactéries à des objets sphériques de taille micronique. La suspension de ces objets dans un milieu aqueux peut être considérée comme une suspension colloïdale. En effet, leur taille est largement supérieure à la taille des molécules du milieu. La dispersion de ces objets en suspension en solution aqueuse dépend des phénomènes de sédimentation et d'agitation thermique.

A. 1. a. Sédimentation

Dans le cadre de la mécanique classique, les forces s'appliquant sur un objet statique en suspension sont la force de pesanteur \vec{F}_P et la poussée d'Archimède \vec{F}_A . Ces forces sont représentées sur le schéma **Fig. III.1**.

$$\vec{F}_P = -m_o \vec{g} = -\rho_o V \vec{g} \quad [29]$$

$$\vec{F}_A = m_L \vec{g} = \rho_L V \vec{g} \quad [30]$$

avec m la masse de l'objet ou du liquide déplacé et V leur volume. Le volume de l'objet et le volume de liquide déplacé sont équivalents. Ce volume est égal à $4/3 \pi a^3$ avec a le rayon de l'objet sphérique.

Dans le cas où l'objet en suspension se déplace une troisième force liée à la viscosité du milieu apparaît : la force de frottement \vec{F}_f (avec μ la viscosité dynamique du fluide et $\vec{v}_{séd}$ la vitesse de sédimentation de l'objet sphérique). Cette force est également représentée sur la modélisation de la **Fig. III.1**.

$$\vec{F}_f = -6 \pi \mu a \vec{v}_{séd} \quad [31]$$

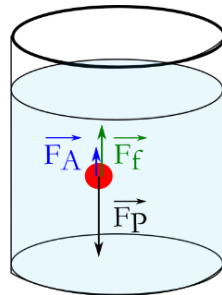


Fig. III.1 – Force de pesanteur \vec{F}_P , poussée d'Archimède \vec{F}_A et force de frottement \vec{F}_f s'exerçant sur une bille en suspension colloïdale.

Dans un système à l'équilibre, la somme de ces trois forces est nulle.

$$\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_A + \mathbf{F}_f = \Delta\rho \frac{4}{3} \pi a^3 \mathbf{g} - 6 \pi \mu a \mathbf{v}_{sed} = \mathbf{0} \quad \text{avec} \quad \Delta\rho = \rho_L - \rho_o \quad [32]$$

La vitesse de sédimentation de l'objet peut alors s'écrire sous la forme :

$$\mathbf{v}_{sed} = \frac{2}{9} \frac{\Delta\rho}{\mu} a^2 \mathbf{g} \quad [33]$$

Et son énergie cinétique de sédimentation :

$$E_{sed} = \frac{1}{2} m_o v_{sed}^2 \quad [34]$$

A. 1. b. Agitation thermique

L'équilibre statique d'un liquide observé à l'échelle macroscopique est le résultat moyenné du comportement d'un grand nombre de molécules. A l'échelle microscopique, elles sont animées en permanence d'un mouvement d'agitation thermique. Chacune d'entre elles possède une énergie thermique qui se traduit sous la forme d'une énergie cinétique E_{th} dont la valeur moyenne est :

$$\langle E_{th} \rangle = \frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{3}{2} K_B T \quad [35]$$

avec m la masse de la molécule, $\langle v \rangle$ la valeur moyenne de sa vitesse, K_B la constante de Boltzmann et T la température du système.

La proximité des molécules au sein du liquide amène un grand nombre de collisions entre elles du fait de cette énergie cinétique. La nature isotrope de ces collisions induit le déplacement aléatoire de chaque molécule. Ces chocs communiquent une certaine énergie cinétique à l'objet en suspension dans le liquide. Il possède alors la même énergie thermique que chacune des molécules du milieu (en supposant les chocs élastiques). Au contraire de l'énergie cinétique liée au phénomène de sédimentation, cette énergie ne dépend pas des paramètres de l'objet.

Pour que l'objet reste en suspension, il faut que l'énergie cinétique due à l'agitation thermique soit supérieure à celle liée à la sédimentation :

$$E_{th} > E_{sed} \quad [36]$$

Ce qui se traduit par la contrainte sur le rayon de l'objet :

$$r < \left(\frac{729}{16} \frac{\mu^2 K_B T}{\pi \rho_o \Delta\rho^2 g^2} \right)^{\frac{1}{7}} \quad [37]$$

Cas d'une bactérie

La masse volumique d'une bactérie est d'environ 1137 kg/m³ (1,1166 g/ml pour *E. coli* et 1,1571 g/mL pour *L. innocua* [ref 1]). Pour qu'une population de bactéries reste en suspension, le rayon maximal de chaque bactérie doit donc valoir 11,5 µm à 20°C. A titre de comparaison, les billes de polystyrène avec lesquelles nous travaillions précédemment avaient une masse volumique d'environ 1050 kg/m³ ce qui représente un

rayon maximal de $15,4\ \mu\text{m}$ pour rester en suspension [ref 2,3]. Ces dimensions sont bien supérieures à celles des objets que nous étudions (billes ou bactéries).

Nous montrons ici que les bactéries peuvent être considérées comme colloïdales et sont en suspension avec un phénomène de sédimentation négligeable. De plus, le fait d'utiliser un système de fluidique statique assure l'absence d'écoulement dans le fluide. Dans ce milieu ils se déplacent en permanence grâce à leur énergie thermique. L'ensemble de ces conditions mettent en évidence le caractère brownien de leur mouvement [ref 4].

Les bactéries sont souvent des objets plus complexes que des objets sphériques inertes. Certaines d'entre elles possèdent une énergie et un moyen de propulsion intrinsèque (flagelle, pilli). L'étude réalisée ici concerne les objets sphériques, homogènes et non déformables. Le déplacement des bactéries ne peut donc pas être considéré comme strictement brownien. Cependant, en première approximation, les outils d'analyse des déplacements browniens exposés par la suite permettent de décrire les déplacements bactériens en l'absence de déplacements importants liés à leurs flagelles.

A. 2. Protocole expérimental

Le système de visualisation enregistre jusqu'à 60 images par seconde sur lesquelles la position de l'objet étudié est détectée grâce à la macro *Mosaic* de tracking de *Fiji*, module de traitement d'image du logiciel *Image J* [ref 5]. Ce module est adapté à la détection d'objets sphériques lumineux sur des images de fond sombre. Il est donc particulièrement adapté à l'étude de trajectoires d'objets fluorescents. Afin d'étudier la trajectoire des bactéries, elles sont assimilées à des sphères lorsque leur rapport de forme ne dépasse pas un facteur 2 ($1 \times 2\ \mu\text{m}$). Dans le cas contraire la détection est faite manuellement en trois points : le centre et les deux extrémités de la bactérie. C'est le cas de *B. subtilis* dont le rapport de forme est supérieur à 3 ($1 \times 3\ \mu\text{m}$). Sur la **Fig. III.2** nous pouvons observer l'exemple des trajectoires de bactéries *S. epidermidis* en suspension dans de l'eau déionisée pendant 50 secondes (température ambiante).

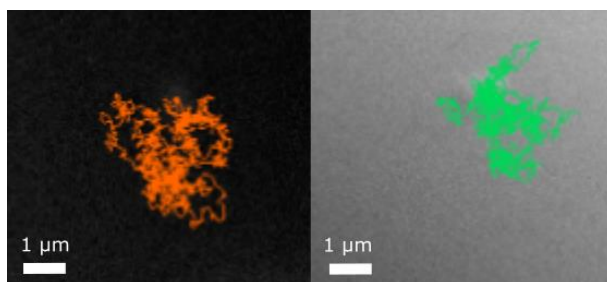


Fig. III.2 – Trajectoire de deux bactéries *S. epidermidis* en suspension dans de l'eau déionisée, 24 images par secondes sont analysées pendant 50 secondes.

A. 3. Analyse de trajectoires

Plusieurs paramètres permettent de caractériser les trajectoires des bactéries. Nous avons choisi d'analyser ces trajectoires par le calcul des dimensions du rectangle dans lequel est inscrit le déplacement des bactéries (**Fig III.3**). Les trajectoires que nous analysons sont celles de bactéries libres (mouvement brownien) en suspension dans de l'eau déionisée et celles de bactéries piégées par nos structures à cristaux photoniques. Les lettres B et P signifient respectivement « Brownien » et « Piégée ».

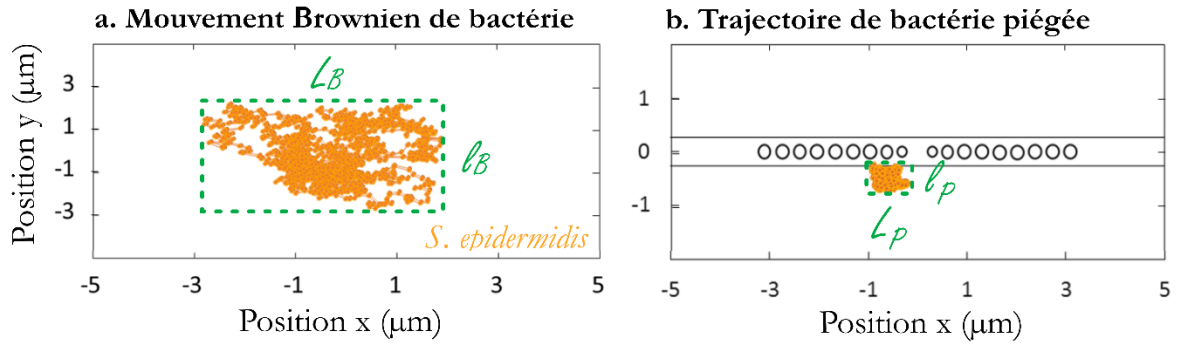


Fig. III.3 – **a.** Mouvement brownien d'un *diplococcus* de *S. epidermidis*. **b.** Trajectoire de la même bactérie piégée. Les trajectoires ont été enregistrées sur 50 secondes et chaque point représente la position du centre de la bactérie.

La lettre « L » caractérise la longueur du déplacement (dans la direction latérale x) et la lettre « ℓ » désigne la largeur du déplacement (dans la direction transverse y).

On définit le confinement transverse comme le rapport ℓ_B / ℓ_P et le confinement latéral comme le rapport L_B / L_P . Ces paramètres traduisent le rapport entre le déplacement d'une bactérie non piégée et celui d'une bactérie piégée, dans les dimensions transverses et latérales. Le facteur de confinement est le rapport entre les aires de déplacement (approximées par un rectangle) d'une bactérie non piégée et d'une bactérie piégée : $L_B \cdot \ell_B / L_P \cdot \ell_P$.

A. 4. Conclusion

La caractérisation spatiale des bactéries permet, grâce au système de visualisation situé au-dessus de l'échantillon, l'étude de la trajectoire des bactéries. Elle peut être considérée comme brownienne pour une bactérie en suspension en milieu aqueux. La trajectoire de ces bactéries dites « libres » est comparée à celle de bactéries piégées sur cristaux photoniques au **Chapitre V** grâce aux éléments d'analyse (confinement) introduits ici.

B) Caractérisation temporelle

La caractérisation temporelle repose sur l'analyse du signal optique transmis par la structure. Elle permet l'étude des propriétés d'une structure optique (longueur d'onde, facteur de qualité) et l'analyse de son interaction avec un objet piégé.

B. 1. Concepts généraux

B. 1. a. Protocole expérimental

Lorsque nous souhaitons caractériser une structure optique, la première étape consiste à coupler la fibre d'injection à cette structure. Une position précise de la fibre permet de maximiser la lumière injectée. Une fois cette position atteinte, un intervalle de longueur d'onde est injecté (Scan) afin de déterminer la longueur d'onde de résonance du résonateur et son facteur de qualité.

Pour piéger un objet, la longueur d'onde de résonance est injectée dans la structure, à puissance et polarisation constantes.

Le signal optique transmis par la structure est une intensité, proportionnelle à la quantité de photons détectée en sortie de structure. Le facteur de proportionnalité est dû aux transformations du signal optique entre sa détection et son enregistrement. L'énergie des photons est détectée puis convertie en courant (0,9 A/W). Ce dernier est ensuite converti en tension grâce à un pré-ampli de résistance 1 M Ω . Les valeurs d'intensité seront toujours données en unité arbitraire (u.a.) pour plus de lisibilité mais elles sont en Volts et prennent en compte un facteur de multiplication 10⁶.

B. 1. b. Signaux transmis par les structures optiques

Lorsque la longueur d'onde de résonance de la structure est injectée, le signal transmis par cette structure correspond à une valeur d'intensité maximale (I_{max} , **Fig. III.4a**) pour les cristaux photoniques 1D. Seule la longueur d'onde de résonance du cristal 1D pourra résonner entre les deux séries de trous du cristal et être transmise par la structure. Pour les cristaux photoniques 2D, un couplage optimisé à la longueur d'onde de résonance de la structure correspond à une valeur minimale d'intensité transmise (I_{min} , **Fig. III.4b**). Ce phénomène est dû au fait que la lumière est couplée au cristal 2D par un guide silicium. La longueur d'onde de résonance de la structure a donc dropé dans le cristal et nous observons en sortie de guide la transmission de toutes les longueurs d'ondes injectées, sauf la longueur d'onde de résonance du cristal 2D. Les signaux transmis par les deux types de cristaux photoniques sont représentés **Fig. III.4**.

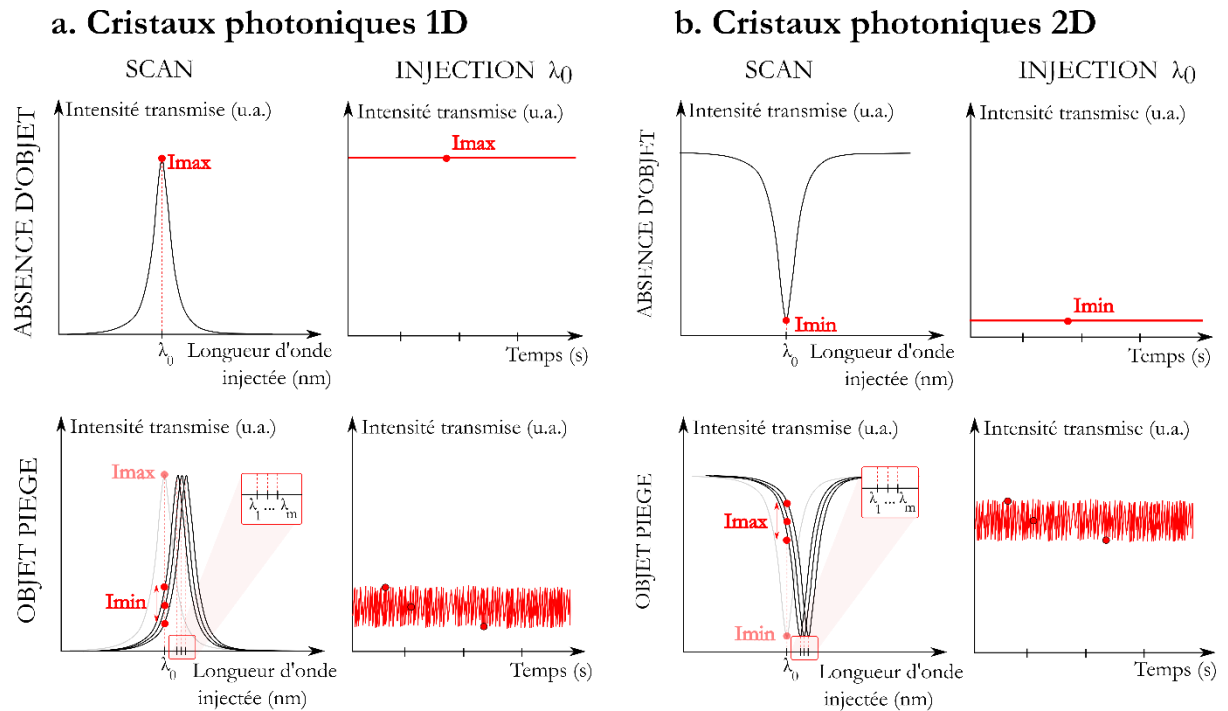


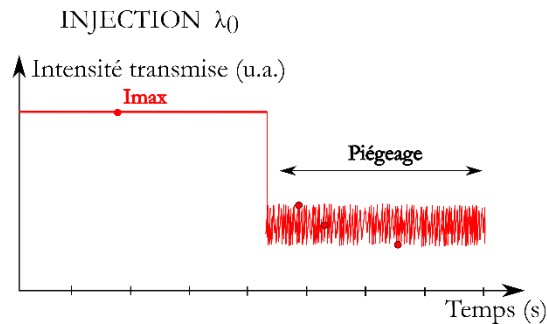
Fig. III.4 – Signaux transmis par différents résonateurs optiques en absence (première ligne) et en présence (deuxième ligne) d'objet piégé. Dans chacun des cas les signaux transmis lorsqu'on injecte une plage de longueurs d'onde (SCAN) ou la longueur d'onde de résonance de la structure optique (λ_0) sont représentés. Ces signaux sont représentés dans le cas de cristaux photoniques 1D (a) ou des cristaux photoniques 2D (b).

A la longueur d'onde de résonance, lorsque la puissance injectée est suffisante, les conditions sont réunies pour piéger une bactérie. La puissance requise pour piéger une bactérie dépend à la fois de son volume, de son indice et du type de cristal photonique utilisé. Elle est comprise entre 2 et 15 mW pour les cristaux photoniques 2D et entre 6 et 15 mW pour les cristaux 1D pour les bactéries que nous avons étudiées (**Chapitre IV**). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les cristaux photoniques 2D concentrent la lumière dans la cavité creuse, d'indice faible, tandis que les cristaux photoniques 1D la concentrent dans l'indice fort et par la différence de raideur entre ces deux pièges.

L'indice optique des bactéries étant supérieur à celui du milieu dans lequel elles se trouvent en suspension, leur interaction avec le champ électromagnétique des structures optiques décale la longueur d'onde de résonance de cette dernière vers de plus hautes longueurs d'onde. Le piège peut être assimilé à un « bol de potentiel » dans lequel les bactéries vont évoluer sans pouvoir nécessairement en sortir. Ce déplacement des bactéries piégées occasionne un recouvrement champ-bactérie qui varie au cours du temps. Cette variation de recouvrement entraîne une variation de longueur d'onde de résonance de la structure optique entre deux points ($\lambda_0 \dots \lambda_m$). Le premier représente le recouvrement champ-bactérie minimal et correspond à la résonance sans bactérie dans le piège (λ_0). Le second représente le recouvrement maximal, lorsque le maximum du volume de la bactérie se trouve en interaction avec le champ (λ_m). Les signaux transmis par les différentes structures au cours du piégeage d'un objet (bille ou bactérie) sont également représentés **Fig. III.4**.

Finalement, le piégeage d'une bactérie est marqué par deux phénomènes (**Fig. III.5**). Le premier est une variation brutale de l'intensité transmise au moment où la bactérie entre en interaction avec le piège. Cette variation correspond à une diminution pour les cristaux photoniques 1D et à une augmentation pour les cristaux photoniques 2D. Le second phénomène consiste en des oscillations haute fréquence de l'intensité transmise.

a. Cristaux photoniques 1D



b. Cristaux photoniques 2D

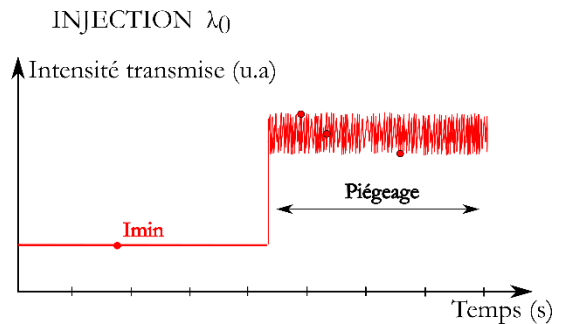


Fig. III.5 – Signaux de piégeage transmis par un cristal photonique 1D (a) et 2D (b). Le piégeage est caractérisé par une brusque variation d'intensité transmise et des oscillations basse fréquence.

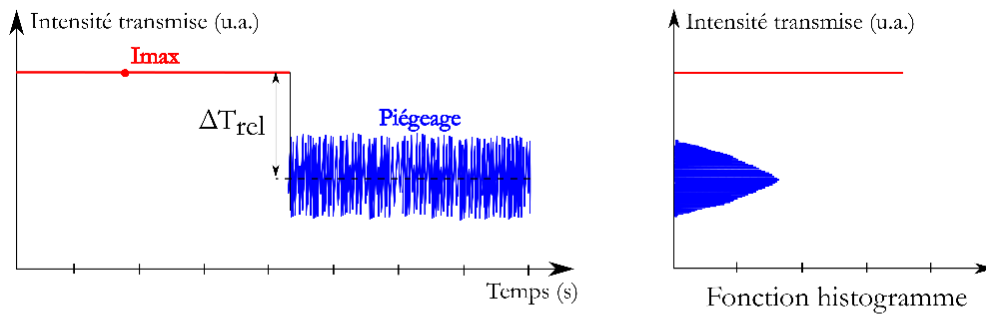
L'analyse des signaux de piégeage consiste à extraire de l'information de la brusque variation d'intensité qui marque le début de l'interaction bactérie-cavité, de l'amplitude et de la fréquence des oscillations enregistrées lors du piégeage.

B. 1. c. Analyse des signaux optiques

Afin de caractériser la variation d'intensité liée au début de l'interaction bactérie-cavité, nous définissons le paramètre ΔT_{rel} (décalage en transmission relatif). Il représente le décalage entre la valeur moyenne d'intensité transmise lorsque la bactérie est piégée et la valeur moyenne d'intensité transmise lorsque la cavité est vide. Ce paramètre est représenté **Fig. III.6**.

L'amplitude des oscillations lors du piégeage est quant à elle caractérisée par le calcul de la fonction histogramme du signal de piégeage. Cette fonction représente la probabilité d'occurrence de chaque valeur d'intensité transmise. En d'autres termes, elle permet de représenter le nombre de fois que chaque valeur précise d'intensité est transmise par la structure pendant un temps donné.

a. Cristaux photoniques 1D



b. Cristaux photoniques 2D

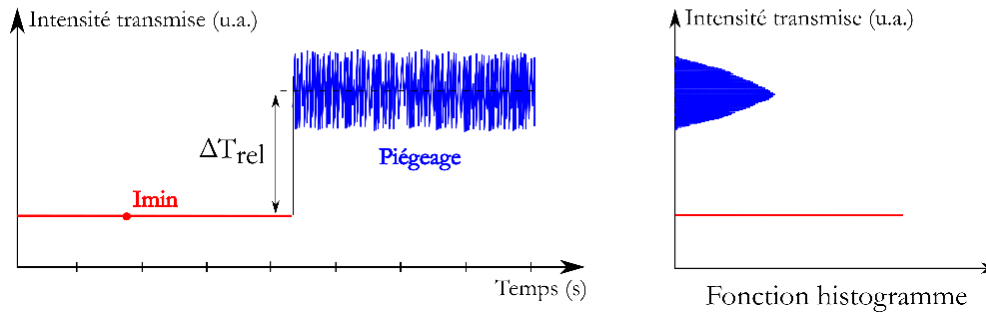


Fig. III.6 – Signaux de piégeage transmis par un cristal photonique 1D (a) et 2D (b) et paramètres d'analyse de ces signaux. ΔT_{rel} , le décalage en transmission relatif traduit la variation d'intensité transmise au moment où l'objet commence à interagir avec le champ de la structure à cristaux photoniques. La fonction histogramme permet de caractériser la répartition (occurrence) des niveaux d'intensité transmis au cours du temps.

La fonction histogramme du signal transmis par la structure sans piégeage (rouge) et avec piégeage (bleu) sont représentés **Fig. III.6**. Le signal transmis en absence de piégeage correspondant à une seule valeur d'intensité, sa fonction histogramme présente cette unique valeur d'intensité. Chaque type d'objet piégé ayant un signal de piégeage qui lui est propre, sa fonction histogramme lui est caractéristique. La largeur à mi-hauteur de cet histogramme sera utilisée par la suite pour discriminer le type d'objet piégé (**Chapitre V**).

B. 1. d. Conclusion

L'analyse du signal optique transmis par la structure de piégeage permet de caractériser à la fois la structure optique elle-même (résonance) et son interaction avec une bactérie piégée (signaux de piégeage). Lors du piégeage, le signal optique est analysé au moyen de la fonction histogramme qui permet de caractériser la répartition (occurrence) des niveaux d'intensité transmis au cours du temps. Dans la partie suivante est développée la caractérisation des cristaux photoniques 1D et 2D. Les signaux de piégeage de bactéries seront présentés **Chapitres V et VI**.

B. 2. Caractérisation expérimentale des résonateurs optiques

Les cristaux photoniques dont la fabrication est présentée au **Chapitre II** présentent des résonances adaptées au piégeage de bactéries et à leur analyse. Les facteurs de qualité de ces structures sont classiquement compris entre 3000 et 6000. Cela permet de piéger les bactéries avec une faible contrainte (notion de « piège large »), leur laissant exprimer des propriétés de mobilité qui leurs sont propres. Ces résonances, montrées **Fig. III.7** dans l'EDI, sont également à des longueurs d'onde nous permettant d'utiliser toute la gamme de puissances dont les lasers disposent (maximum entre 1480 nm et 1530 nm).

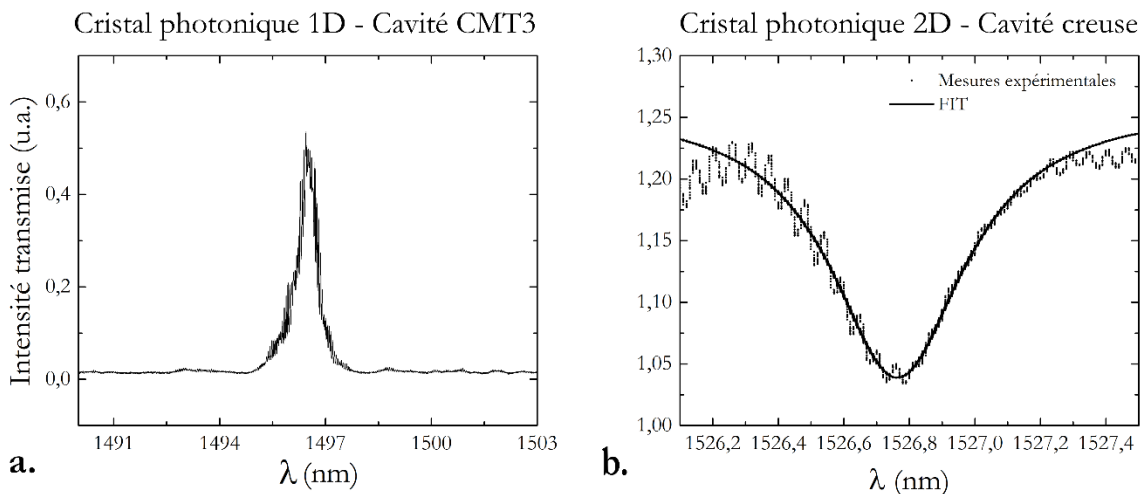


Fig. III.7 – Figures de résonance d'un cristal photonique 1D, CMT3 (a) et d'un cristal photonique 2D   cavité creuse (b). Mesures expérimentales dans l'eau déionisée.

Les paramètres de design et les paramètres les plus critiques de fabrication (rugosité des flancs des structures, taille des trous et suspension des membranes) ont donc été optimisés pour les applications que nous souhaitons faire des cristaux photoniques 1D et 2D.

B. 2. a. Indice optique

L'objectif de ce paragraphe est également de déterminer l'influence de l'indice du milieu ou d'un objet piégé et de la température sur la longueur d'onde de résonance et le facteur de qualité de cristaux photoniques 1D et 2D. Les résultats présentés reposent à la fois sur des résultats expérimentaux et sur des calculs numériques (simulation 3D).

1. Influence du milieu

L'indice optique du milieu dans lequel se trouve le résonateur optique a principalement une influence sur la longueur d'onde de résonance de ce dernier. Ce phénomène est modélisable par simulation FDTD et observable expérimentalement. Les résultats présentés ici sont basés sur l'analyse d'un cristal photonique 1D.

Une première série de mesures a été effectuée afin d'évaluer le décalage de la longueur d'onde d'une microcavité CMT lorsque l'indice du milieu extérieur varie entre 1,33 et 1,41. Afin de réaliser des milieux dont l'indice variait entre ces deux valeurs, différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) et de Ficoll400 (dilution dans l'eau) ont été utilisées, selon les données du tableau **Fig. III.8a**.

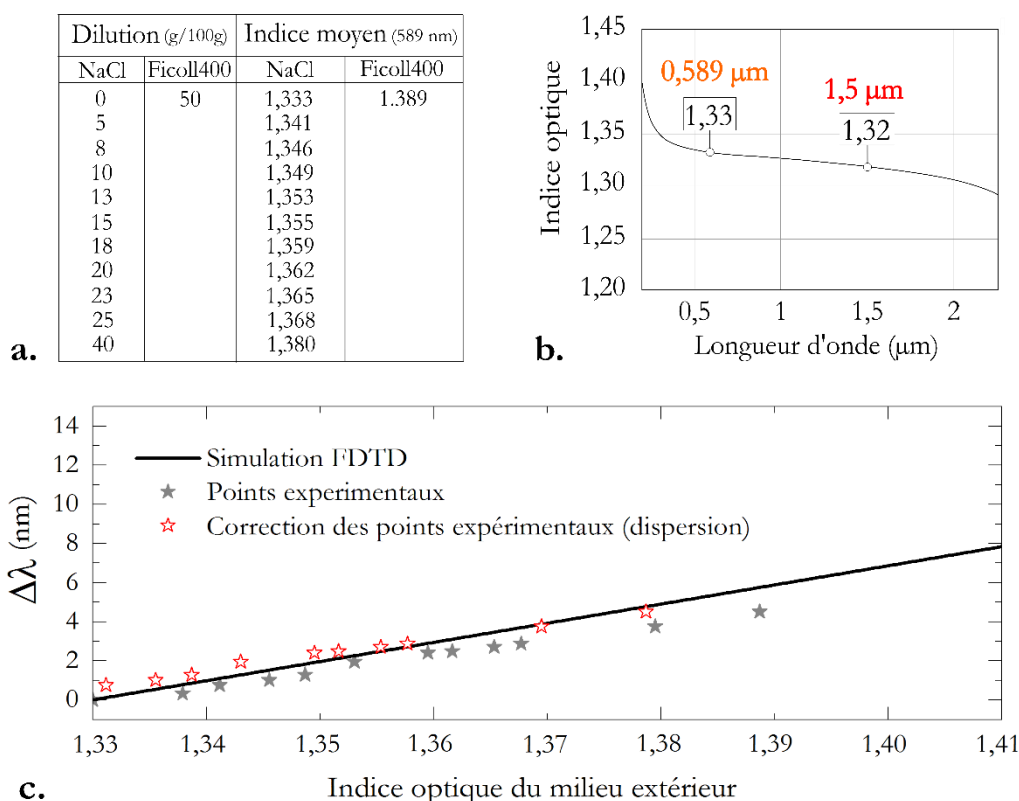


Fig. III.8 – a. Tableau de dilution du NaCl et du Ficoll400. b. Dispersion de l'indice optique de l'eau en fonction de la longueur d'onde à 25°C. c. Décalage de la longueur d'onde de résonance d'une microcavité CMT3 en fonction de l'indice du milieu dans lequel elle se trouve. Simulation FDTD et mesures expérimentales.

Protocole

Le Ficoll400 est un polysaccharide synthétique qui présente une solubilité de 100 % dans l'eau et permet donc d'obtenir des milieux d'un indice optique supérieur à ceux obtenus en diluant du NaCl dans de l'eau (limite de solubilité à <40 %, correspondant à un indice de 1,38 à 589 nm). L'indice optique de ces milieux a ensuite été mesuré au réfractomètre d'Abbé à une longueur d'onde de 589 nm et une température de 23°C avec une précision de l'ordre de 10^{-3} . Ces milieux ont ensuite été placés dans le bassin en PDMS d'une puce optofluidique et la longueur d'onde de résonance d'une CMT3 a été mesurée pour chacun d'eux. Entre chaque milieu testé la puce a été rincée (EDI) et séchée (flux d'azote).

En parallèle, une simulation FDTD 3D a permis de calculer la longueur d'onde de résonance de cette structure CMT3 en fonction de l'indice du milieu extérieur. L'indice est cette fois-ci valable à la longueur d'onde injectée dans la structure virtuelle, c'est-à-dire autour de 1,5 μm . Les résultats des mesures et des calculs de longueur d'onde de résonance en fonction de l'indice du milieu sont présentés **Fig. III.8c**. La longueur d'onde de résonance étant un paramètre structure-dépendant nous avons choisi de représenter uniquement le décalage en longueur d'onde de la résonance par rapport à la longueur d'onde de résonance de la structure dans l'eau (indice $n=1,33$), qui constitue notre milieu de référence.

Il est important de prendre en compte le fait que les indices optiques utilisés pour la simulation sont valables à la longueur d'onde de résonance de la cavité, c'est-à-dire à environ 1,5 μm . Les valeurs d'indice optique mesurées sur les milieux réels ont été déterminées à une longueur d'onde de 589 nm (réfractomètre). Or l'indice d'un matériau ou d'un milieu dépend de la longueur d'onde d'observation, c'est le phénomène de dispersion. Ce phénomène est représenté pour l'eau à 25°C **Fig. III.8b [ref 6]**. En première approximation nous pouvons utiliser cette figure pour appliquer une correction à nos points expérimentaux (**Fig. III.8c**). Par exemple la mesure de l'indice du premier milieu qui vaut 1,33 à 589 nm vaudra 1,32 à 1,5 μm . Ces résultats, tant théoriques qu'expérimentaux, démontrent la dépendance de la longueur d'onde de résonance des structures optiques à l'indice du milieu dans lequel elles se trouvent.

Le décalage en longueur d'onde de résonance des structures optiques étudiées dans des milieux d'indice variable n'influence pas leur facteur de qualité. Ce phénomène est montré dans la **Fig. III.9** qui représente la résonance d'une structure CMT3 dans les milieux d'indice compris entre 1,33 et 1,38 (réalisés par dilution de NaCl).

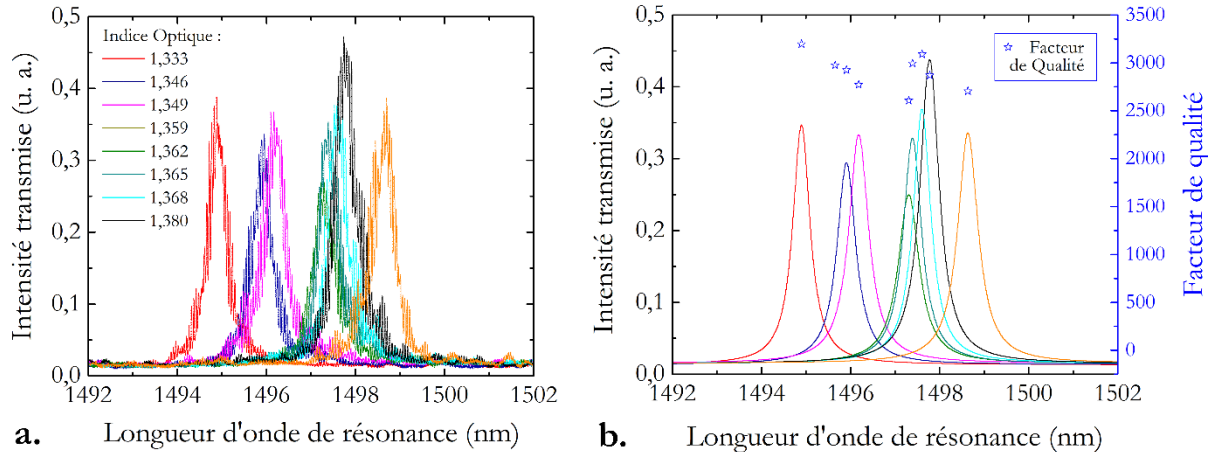


Fig. III.9 – a. Figures de résonance expérimentales d'une structure CMT3 en présence de milieux d'indices variant de 1,333 à 1,389. Ces milieux ont été réalisés par dilution de NaCl et de Ficoll. **b.** Fit Lorentzien et facteur de qualité des figures de résonance montrées **Fig. III.9a**.

2. Influence d'une bactérie piégée

Lorsqu'une bactérie entre en interaction avec le piège, du fait de son indice plus haut que celui du milieu dans lequel elle se trouve **[ref 7]** (eau principalement), sa présence cause un décalage vers le rouge de la longueur d'onde de résonance de la structure optique. Ce décalage dépend à la fois du volume de la bactérie en interaction avec le champ électromagnétique du résonateur et de son indice. Plus l'indice et le recouvrement sont importants, plus le décalage est important. Le recouvrement champ-bactérie dépend

principalement de son déplacement dans le piège. Ce déplacement peut être horizontal ou vertical (on parle alors de l'altitude de la bactérie). Le déplacement horizontal est quantifiable par le suivi (tracking) de la bactérie piégée grâce au système de visualisation situé au-dessus de l'échantillon (caractérisation spatiale, **partie A**). L'altitude de la bactérie cependant ne peut pas être mesurée, mais des simulations permettent de quantifier son influence sur la longueur d'onde de résonance des résonateurs.

Le logiciel de simulation FDTD présenté précédemment permet la modélisation d'objets positionnés aux abords d'une microcavité (exemple d'une CMT3 **Fig. III.10**). Nous avons modélisé un objet de type bactérie *E. coli*, c'est-à-dire un bâtonnet de dimensions $1 \times 2 \mu\text{m}$ d'indice 1,38. Cet indice optique a été choisi en accord avec les travaux de J. B. Bateman *et al.* [ref 7] selon lesquels l'indice moyen d'une bactérie serait compris entre 1,368 et 1,413.

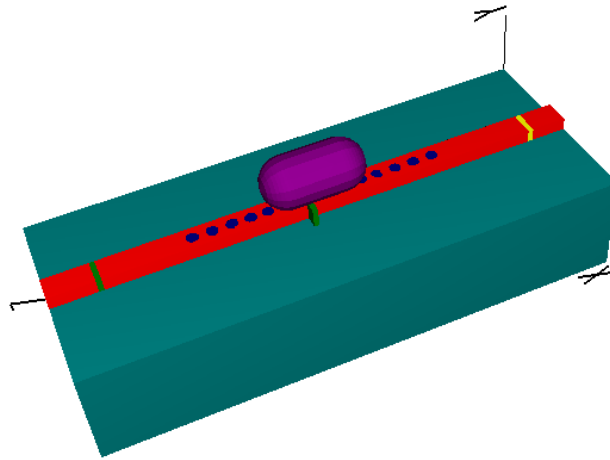


Fig. III.10 – Modélisation 3D d'une bactérie en interaction avec le champ électromagnétique d'un cristal photonique 1D (CMT3).

De la même manière que précédemment la répartition de champ a été calculée en présence de la bactérie. Ces calculs ont permis de déterminer l'épaisseur d'interaction entre la partie évanescente du champ électromagnétique de la cavité et une bactérie piégée. Ces résultats sont représentés **Fig. III.11**.

On observe tout d'abord qu'en modélisant une bactérie au contact de la structure optique (c'est-à-dire en maximisant l'épaisseur d'interaction), seules les premières dizaines de nanomètres de la bactérie interagissent avec le champ (**Fig. III.11a**).

Afin de déterminer avec précision cette épaisseur d'interaction bactérie-champ évanescent nous avons modélisé une bactérie d'indice 1,38 à différentes altitudes (distance cavité-bactérie) comprises entre 0 et 100 nm. La bactérie est modélisée dans un environnement aqueux (indice $n=1,33$) et est centrée sur la structure optique. Nous avons ensuite calculé la longueur d'onde de résonance de la microcavité en fonction de ces différentes positions de la bactérie. Le paramètre $\Delta\lambda$ est calculé. Il correspond au décalage de la longueur d'onde de résonance de la microcavité lors d'une mesure par rapport à la longueur d'onde de résonance de la microcavité dans l'EDI (sans objet piégé) : $\Delta\lambda = \lambda_{\text{rés.mesure}} - \lambda_{\text{rés.EDI}}$. Ces résultats sont présentés **Fig. III.11b**.

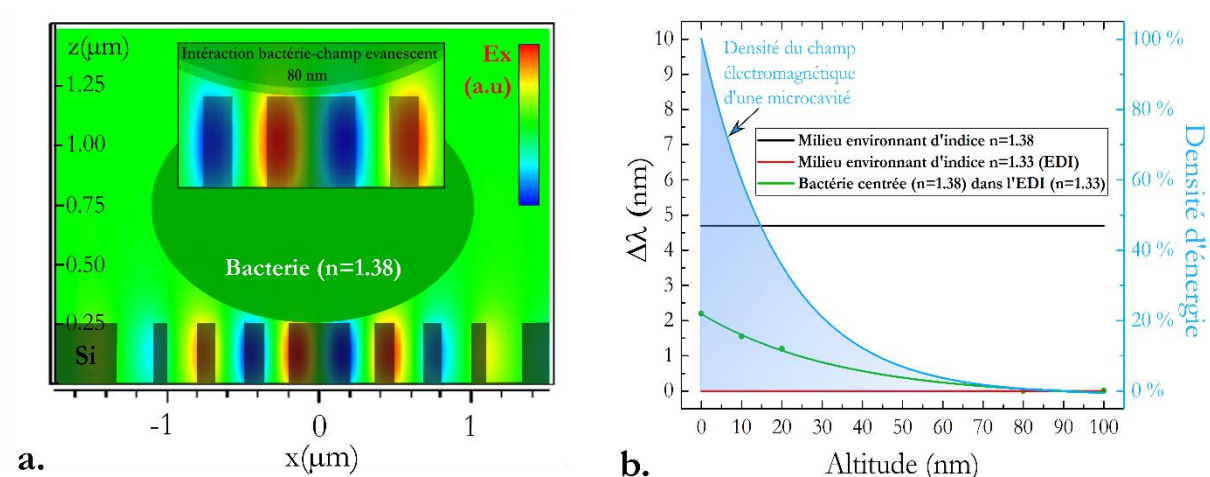


Fig. III.11 – **a.** Répartition du champ électromagnétique dans les structures nanobeam (CMT3). **b.** Calcul du décalage en longueur d'onde de résonance d'une microcavité ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{rés.mesure}} - \lambda_{\text{rés.EDI}}$) dans le cas d'un milieu aqueux ($n=1,33$), d'un milieu d'indice $n=1,38$ et dans le cas d'une bactérie à différentes altitudes dans un milieu aqueux.

On observe tout d'abord que plus la bactérie est éloignée de la microcavité, plus $\Delta\lambda$ est faible. Ce phénomène est dû au fait que le volume de recouvrement champ-bactérie décroît quand la bactérie s'éloigne de la structure optique. On observe également qu'à partir de 80 nm la présence de la bactérie n'a plus d'influence sur la longueur d'onde de résonance de la microcavité. En d'autres mots, il n'y a plus d'interaction bactérie-champ lorsque la distance bactérie-cavité est égale ou supérieure à 80 nm. On peut donc estimer l'épaisseur d'interaction bactérie-champ évanescent à 80 nm.

Sur la **Fig. III.11b** sont également représentés les décalages en longueur d'onde de résonance de la microcavité lorsqu'elle se trouve dans un milieu dont l'indice est égal à celui d'une bactérie ($n=1,38$) et dans l'eau ($n=1,33$). Lorsque la cavité se trouve dans l'eau le décalage $\Delta\lambda$ est nul. Lorsqu'elle se trouve dans un milieu d'indice $n=1,38$ le décalage $\Delta\lambda$ est deux fois plus important que celui occasionné par une bactérie qui se trouve au contact de la structure, environnée d'eau. De la même façon que précédemment, cela est dû au recouvrement champ évanescent-volume d'indice $n=1,38$ plus important que dans le cas d'une bactérie piégée.

Lors de nos mesures expérimentales, deux paramètres sont inconnus : l'altitude et l'indice optique de la bactérie. Sur la figure **Fig. III.11b** est représentée la variation du décalage en longueur d'onde de la résonance de la cavité $\Delta\lambda$ en fonction de l'altitude d'une bactérie d'indice $n=1,38$ centrée sur la microcavité. Nous avons réalisé ces mêmes calculs pour des bactéries d'indices différents, compris entre 1,33 et 1,41. Ces calculs ont permis de réaliser un abaque qui relie le décalage en longueur d'onde de la résonance de la cavité, l'altitude de la bactérie et son indice. Il est représenté **Fig. III.12**. Cet abaque sera utilisé par la suite pour déterminer l'altitude et l'indice des bactéries piégées lors des mesures expérimentales.

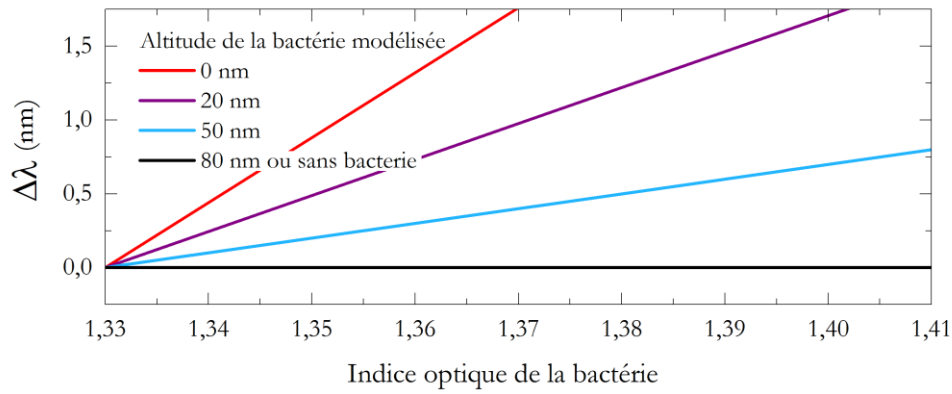


Fig. III.12 – Abaque reliant le décalage en longueur d’onde de la résonance de la cavité $\Delta\lambda$, l’altitude de la bactérie et son indice.

Nous montrons ici l'influence de l'indice et du recouvrement champ-bactérie sur la longueur d'onde de résonance. Les calculs réalisés donnent des informations de première importance pour la compréhension complète du piégeage d'un objet. Ils nous apportent notamment des informations sur l'altitude et l'indice d'un objet piégé, informations auxquelles nous n'avons pas accès de manière expérimentale.

B. 2. b. Température

La température influence également la longueur d’onde de résonance des résonateurs optiques. Le module Peltier décrit **Chapitre II, Paragraphe D.2.b.** a permis d’évaluer l’influence de ce paramètre sur des cristaux photoniques 1D et 2D entre 10 et 50 °C, pour deux milieux différents (air et eau déionisée). La longueur d’onde de résonance d’un cristal photonique 1D à cavité CMT3 a été mesurée à 10°C, 20°C, 30°C, 40°C et 50°C. Les mêmes mesures ont été effectuées pour un cristal 2D à cavité creuse. Certaines mesures n’ont pas pu être effectuées dans l’EDI (température > 30°C) pour des raisons de formation de bulles d’air dans le canal microfluidique. Les résultats expérimentaux sont présentés **Fig. III.13**.

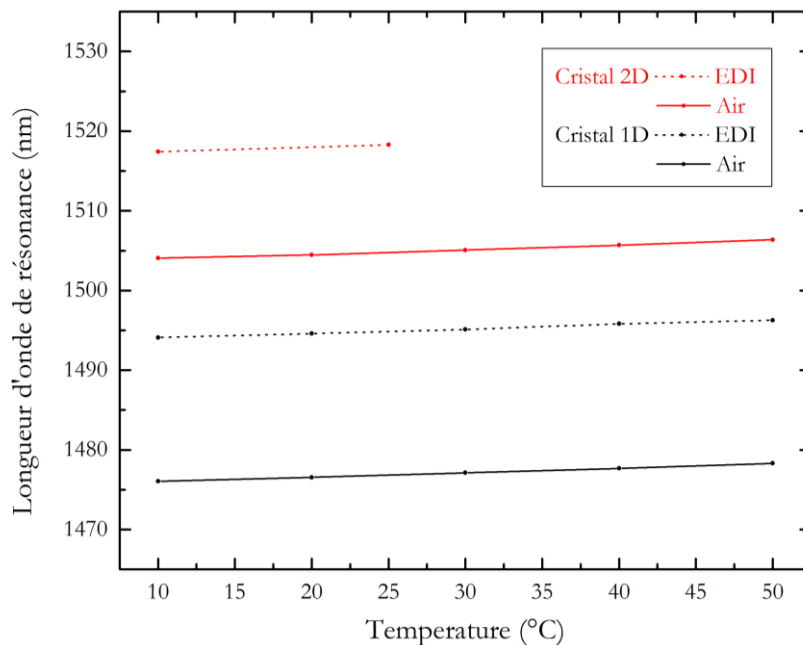


Fig. III.13 – Mesures expérimentales de l’influence de la température sur la longueur d’onde de résonance de cristaux 1D (CMT3) et 2D lorsqu’ils se trouvent dans l’air ou dans l’eau déionisée (EDI).

On observe premièrement le décalage en longueur d'onde de résonance due à la variation d'indice entre les deux milieux (air – indice de 1,00 - et EDI - indice de 1,33 à température ambiante). Ce décalage est d'environ 18,0 nm ($18,02 \pm 0,07$ nm sur 5 mesures) pour le cristal photonique 1D étudié et d'environ 12,5 nm pour le cristal 2D. On observe également le décalage en longueur d'onde de résonance occasionné par l'augmentation de température : entre 10°C et 50°C, la longueur d'onde de résonance augmente d'environ 2,3 nm ($2,29 \pm 0,01$ nm sur 4 mesures) ce qui représente une augmentation de 0,06 nm/°C. Les deux types de cristaux photoniques répondent de manière très similaire à ces tests en température.

L'injection de puissances laser élevées dans les structures optiques peut augmenter la température interne du piège. Sur la **Fig. III.14** sont représentées les résonances d'un cristal photonique 1D (CMT3) dans des milieux d'indices compris entre 1,34 et 1,39 lorsque la puissance injectée varie de 2 mW à 10 mW. On observe comme attendu une augmentation d'intensité transmise lorsque la puissance injectée augmente. La longueur d'onde de résonance de la structure augmente en moyenne de $0,04 \pm 0,03$ nm (6 mesures) entre 2 mW et 10 mW d'injection. Au contraire, on observe peu d'influence sur le facteur de qualité. Cette augmentation de température étant très locale, il est difficile de la comparer aux résultats d'élévation de température du milieu et de la structure en entier.

Les valeurs de décalage de longueur d'onde de résonance entre l'air et l'EDI sont ici inférieures aux valeurs théoriques (environ 24 nm pour un cristal photonique 1D et 47,5 nm pour un cristal photonique 2D). Cela peut être dû à un mauvais remplissage des trous du cristal photonique et de l'espace sous le cristal 2D. La variation du remplissage des trous du cristal entraîne une variation de la longueur d'onde de résonance intrinsèque des cristaux photoniques 1D et 2D dans l'EDI. Lors de nos mesures expérimentales nous avons donc pris soin de prendre en compte ce phénomène en étalonnant systématiquement nos mesures (description détaillée **Chapitre VI**).

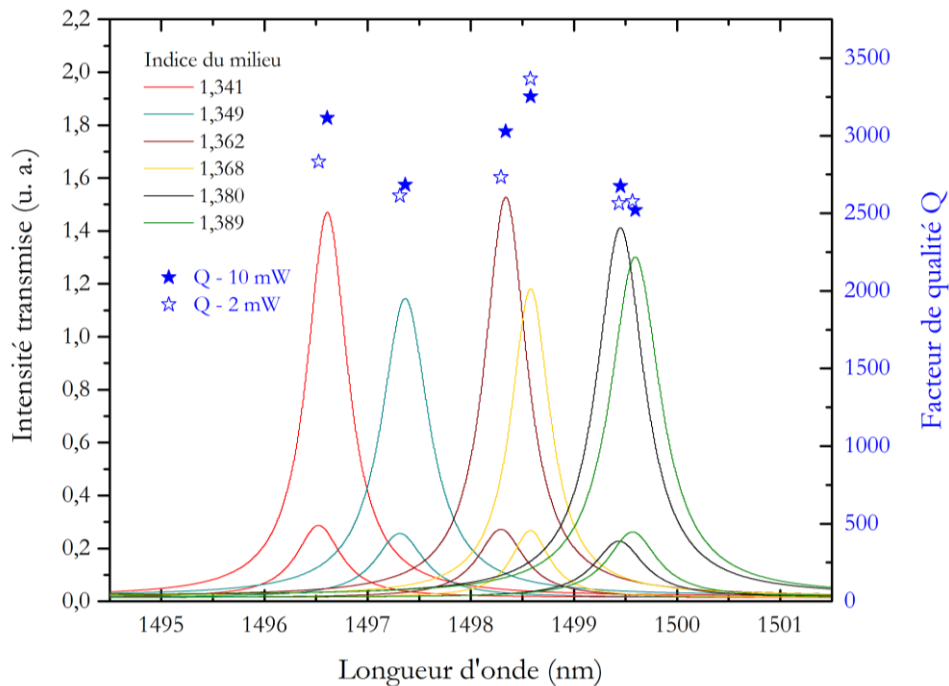


Fig. III.14 – Mesures expérimentales de l'influence de la puissance laser injectée sur la longueur d'onde de résonance d'un cristal 1D (CMT3) dans des milieux d'indice variable.

Il est intéressant de préciser qu'une augmentation de température entraîne une diminution de l'indice de réfraction d'un milieu [ref 8,9]. L'indice de l'eau vaut 1,333 à 20°C et 1,329 à 50°C (à 589 nm). L'indice de l'air varie de 1,00030 à -10°C à 1,00027 à 20°C. Or nous avons montré qu'une diminution d'indice optique du milieu dans lequel se trouvent nos structures optiques entraîne une diminution de la longueur d'onde de résonance de la structure. Il existe donc un autre phénomène qui, lorsque l'on augmente la température de la structure optique, entraîne une augmentation de sa longueur d'onde de résonance. Ce phénomène a une influence plus importante que celle de la diminution d'indice du milieu (EDI, Air) sur la longueur d'onde de résonance des structures. En effet il inverse la tendance et a des effets similaires pour l'air et l'eau, alors que leur variation d'indice en fonction de la température est très différente.

Ce phénomène pourrait être lié à la déformation du silicium en température. Comme beaucoup de matériaux, il se dilate lorsque la température augmente (coefficient de dilatation de 3.10^{-6} K^{-1}). Cela entraîne une modification des paramètres de la structure. Dans le cas d'un cristal photonique 1D (CMT3) ce phénomène modifie les paramètres de longueur de cavité C, de diamètre de trous D et de distance inter-trous L. Comme nous l'avons montré dans le **Paragraphe A. 1. du Chapitre II**, une augmentation de ces paramètres entraîne une augmentation de la longueur d'onde de résonance de la structure optique. Cela pourrait être le cas lors de la dilatation du silicium quand la température augmente. Cette hypothèse est confortée par le fait que les deux types de cristaux photoniques (1D et 2D) ont une réaction similaire et sont fabriqués dans les mêmes matériaux.

C) Conclusion

Ce chapitre permet d'introduire la caractérisation spatiale des bactéries et la caractérisation temporelle des structures optiques et de l'interaction bactérie-cavité. Pour la caractérisation spatiale nous présentons ici les méthodes développées pour l'analyse des trajectoires des bactéries. Nous avons choisi de caractériser les trajectoires des bactéries sur 50 secondes par le rectangle dans lequel elles sont inscrites en introduisant des paramètres de confinement. La caractérisation temporelle concerne l'analyse des signaux transmis par les structures optiques. Cela permet d'étudier les signaux caractéristiques du piégeage de bactéries au travers du calcul de leur fonction histogramme. Cela permet également d'étudier l'influence de paramètres tels que l'indice optique et la température sur les paramètres de résonance des cristaux photoniques (longueur d'onde de résonance et facteur de qualité). Des modélisations numériques ont été effectuées pour déterminer l'influence de l'indice et de l'altitude d'un objet piégé. Des mesures expérimentales ont permis de valider ces modélisations sur l'influence de l'indice optique du milieu sur la résonance des structures. L'influence de la température sur des cristaux photoniques 1D et 2D a été démontrée expérimentalement grâce à la mesure de la résonance de ces structures exposées à des températures comprises entre 10°C et 50°C (système Peltier). L'exploitation de ces méthodes d'analyse permet de traiter les principales problématiques de cette thèse liées au diagnostic bactérien (**Chapitres V et VI**).

Références :

- [1] *Mass and Density Measurements of Live and Dead Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Populations.* C. L. Lewis, C. C. Craig, A. G. Senecal, *WCK Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 12, 3622-3631 (2014).
- [2] 1] T. Pinedo Rivera, *Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné: applications en plasmonique.* PhD thesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I (2009).
- [3] *Piégeage et manipulation d'objets colloïdaux à l'aide de champs optiques confinés sur puces.* C. Pin, *Thèse de l'Université de Bourgogne* (2016).
- [4] *Étude expérimentale du mouvement brownien d'une particule colloïdale.* P. Maurer, J. Ferrand, M. Leocmach, T. Gibaud (2014)
- [5] *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak & A. Cardona, *Nat. Methods* **9**, 676 (2012).
- [6] *Refractive index database.* M. N. Polyanskiy (2008).
- [7] *Refraction and absorption of light in bacterial suspensions.* J. B. Bateman, J. Wagman and E. L. Carstensen, *Kolloid-Z. Polym.* **44**, 208 (1966).
- [8] *Handbook of Optical Materials.* M. J. Weber *et al.* CRC Press (2002).
- [9] *Index of Refraction of Air.* J. A. Stone & J. H. Zimmermann (2000).

IV. Microbiologie et bactéries

A) Propriétés morphologiques

- A. 1. Forme
- A. 2. Mobilité
- A. 3. Membrane

B) Culture et Préparation

- B. 1. Milieu de culture
- B. 2. Condition et temps de culture
- B. 3. Comptage de bactéries
- B. 4. Conclusion

C) Propriétés optiques

- C. 1. Cellule bactérienne
 - C. 1. a. Méthodes
 - C. 1. b. Valeurs d'indice
- C. 2. Membrane bactérienne
- C. 3. Conclusion

D) Bactéries étudiées

- D. 1. Description générale
- D. 2. Préparation des échantillons
- D. 3. Caractérisation en Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

E) Agents antibactériens

- E. 1. Agents physiques
 - E. 1. a. Filtration
 - E. 1. b. Rayonnement ionisant
 - E. 1. c. Température
- E. 2. Agents chimiques
 - E. 2. a. Savons et détergents
 - E. 2. b. Oxydants
 - E. 2. c. Antibiotiques

F) Diagnostic bactérien

- F. 1. Identification
- F. 2. Susceptibilité aux antibiotiques
- F. 3. Conclusion

G) Conclusion

Les bactéries sont des organismes unicellulaires de taille micronique qui présentent les avantages d'être peu contraignantes à cultiver et d'être robustes. Elles peuvent être, entre autres, à l'origine de graves infections du corps humain et représentent donc un sujet d'étude important. L'ensemble de ces caractéristiques nous ont conduit à leur étude par piégeage sur cristaux photoniques. Ce chapitre résume les principales propriétés des bactéries que j'ai étudiées, présente leur mise en culture, leur caractérisation morphologique ainsi que leurs propriétés optiques. Les mécanismes d'actions des principaux agents antibactériens et les outils de diagnostic sont finalement introduits.

Les microbes (bactéries, virus et champignons unicellulaires) constituent la plus importante forme de vie sur notre planète et représentent à eux seuls 60 % de la biomasse totale [ref 1]. Le corps humain pour sa part abrite 100 fois plus de bactéries que de cellules humaines, principalement localisées dans le tube digestif. La cohabitation avec ces différentes bactéries (500 à 1000 espèces [ref 2]) est globalement bénéfique pour l'hôte : aide à l'assimilation des aliments, digestion, protection face aux infections. Une minorité d'espèces bactériennes sont dites pathogènes, c'est à dire pouvant causer une infection chez l'humain. Cependant, du fait de la gravité des maladies engendrées, ce sont ces espèces qui concentrent l'intérêt des microbiologistes.

A) Propriétés morphologiques

Les bactéries sont des **organismes unicellulaires** dont la taille varie de 1 à 10 μm . Elles sont dites **procaryotes**, c'est à dire qu'elles possèdent un unique chromosome sans membrane nucléaire. Leur matériel génétique est donc libre à l'intérieur de la cellule, dans la partie cytoplasmique. Elles peuvent se présenter sous deux formes : la forme végétative et la forme sporulée. La première décrit l'état de référence des bactéries, lorsqu'elles sont dans des conditions favorables, capables de se multiplier par division. La seconde intervient lorsque la bactérie est dans un environnement hostile. Cette forme permet une résistance accrue à la température et aux agressions extérieures, mais présente un métabolisme réduit et une incapacité de se diviser. Un examen microscopique permet d'identifier les différentes propriétés morphologiques des bactéries : taille, forme, mobilité et type membranaire (à l'aide d'un procédé de coloration).

A. 1. Forme

Les bactéries sont principalement de forme sphérique ou allongée (bâtonnets), comme représenté **Fig. IV.1**. Elles sont désignées respectivement par les termes « **Coques ou cocci** » ou « **bacilles** ». Plus rarement, on peut rencontrer des bactéries d'autres formes : les **coccobacilles** ont une forme intermédiaire entre les coques et les bacilles, les **spirochètes** ont une forme hélicoïdale souple tandis que les **spirilles** présentent une structure hélicoïdale rigide.

Certaines bactéries parmi les coques et les bacilles ont tendance à s'associer par deux (**diplocoque** ou **diplobacille**), par chaînes ou sous forme d'amas. Après la division bactérienne les bactéries restent soudées ensemble. C'est le cas du genre *Staphylococcus* par exemple, comme nous le verrons par la suite.

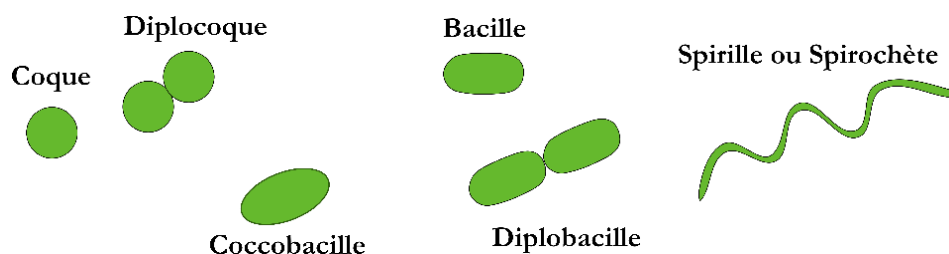


Fig. IV.1 – Différentes formes de bactéries : coque, diplocoque, coccobacille, bacille, diplobacille, spirille et spirochète.

La forme des bactéries est liée à leur structure membranaire. Elle a notamment une influence sur leur mobilité, leur affinité avec les surfaces et leur capacité à acquérir des nutriments.

A. 2. Mobilité

Ce sont principalement les bacilles qui présentent une mobilité. En suspension dans un liquide, cette mobilité dépend de plusieurs facteurs. Elle est en partie passive quand liée à leur mouvement brownien et en partie active quand liée à une activité ou à la morphologie de la bactérie. Pour la partie active les bactéries utilisent des structures qui se trouvent à la surface de leur membrane et que l'on appelle des flagelles. Ce sont de longs appendices protéiques flexibles et leur nombre et leur position diffèrent suivant l'espèce bactérienne (**Fig. IV.2**). On distingue la flagellation monotriche (un flagelle en bout de bactérie) de la flagellation amphitriche (un flagelle de chaque côté de la bactérie) ou péritriche (flagelles sur toute la surface).

Il existe également des appendices filamenteux appelés pili à la surface des membranes bactériennes. Plus courts et plus fins que les flagelles, ils permettent l'adhésion des bactéries entre elles ou sur des surfaces.

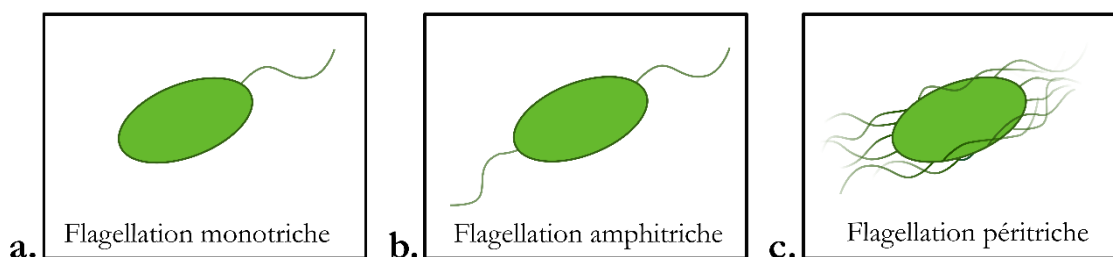


Fig. IV.2 – Différents types de flagelles. **a.** Flagellation monotriche (un flagelle en bout de bactérie) ; **b.** flagellation amphitriche (un flagelle de chaque côté de la bactérie) ; **c.** Flagellation péritriche (flagelles sur toute la surface).

A. 3. Membrane

La paroi membranaire des bactéries leur donne leur forme. Elle les protège également des agressions extérieures tout en autorisant les échanges permettant à la bactérie d'acquérir des nutriments. Cette paroi, semi-perméable à l'eau, assure également le maintien de la pression osmotique des bactéries. Elle permet de réguler la pression interne des bactéries (4 à 20 atmosphères) pour empêcher le passage de l'eau du milieu vers la bactérie dans le cas d'un milieu hypotonique ou de la bactérie vers le milieu dans le cas d'un milieu hypertonique [ref 3,4]. Un milieu hypotonique présente une concentration en substances dissoutes (solutés) plus faible que dans la bactérie. Un milieu hypertonique possède une concentration en solutés plus importante que l'intérieur de la bactérie.

Il existe deux types de structures membranaires : celles dites à Gram-positif et celles dites à Gram-négatif. On classe les bactéries grâce au Test de coloration de Gram [ref 5-6]. Ce test est basé sur l'utilisation successive de colorants et de liquides de rinçage selon le protocole simplifié suivant : coloration au cristal violet (violet de gentiane), rinçage à l'alcool puis coloration à la safranine (fuchsine). La première coloration donne au contenu des bactéries (composants cytoplasmiques) une teinte violette. L'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui sont dites « Gram négatives ». Leur paroi, pauvre en peptidoglycane est en effet perméable à l'alcool et ce dernier va donc rincer le colorant dans la cellule. Les bactéries dites « Gram positives » possèdent une membrane plus épaisse constituée principalement de peptidoglycane, imperméable à l'alcool. Elles vont donc rester violettes après ces deux premières étapes. La dernière coloration a pour but de donner une teinte rose aux bactéries Gram négatives afin de les visualiser. Les bactéries Gram positives restent violettes après cette contre-coloration, et nous pouvons ainsi les distinguer au microscope. Des exemples sont donnés **Fig. IV.3** d'images microscope de bactéries après les colorations du test de Gram.

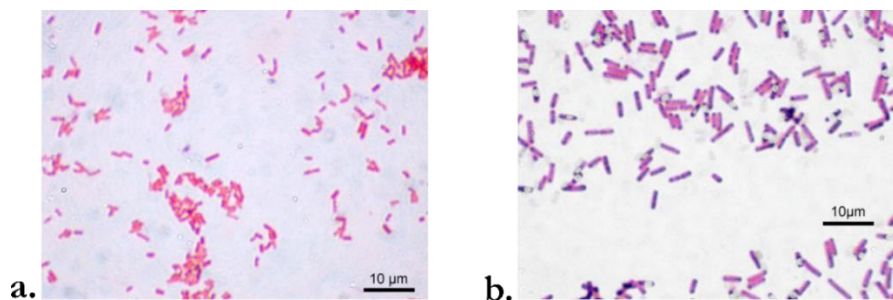


Fig. IV.3 – Exemple de résultats de tests de Gram. **a.** Bactéries *E. coli* à Gram négatif **b.** Bactéries *B. subtilis* à Gram positif. Extrait de Wikipédia « Coloration de Gram ».

Ce test de Gram est un des premiers à être systématiquement effectué dans le cas de l'identification d'une bactérie en milieu clinique [ref 7] et permet donc de distinguer la structure membranaire des bactéries. Cette dernière est détaillée **Fig. IV.4**.

La membrane des bactéries Gram positives est composée d'une membrane plasmique (7,5 nm) entourée d'une épaisse couche de peptidoglycane (20 – 80 nm). Celle des bactéries Gram négatives est composée d'une membrane plasmique, de périplasme (30 – 70 nm) contenant une fine couche de peptidoglycane (5 – 10 nm) et d'une membrane externe (7,5 – 10 nm) [ref 5-6].

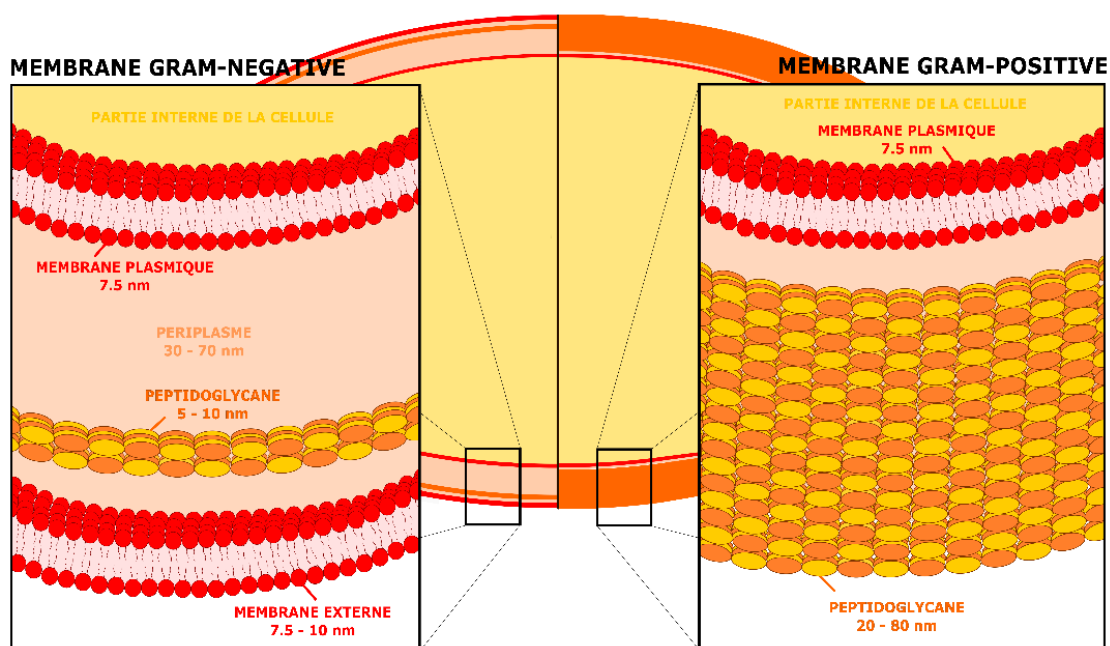


Fig. IV.4 – Structures membranaires des bactéries Gram négatives et Gram positives. Les différents éléments ainsi que leurs dimensions sont représentés (partie interne de la cellule, membrane plasmique, périplasme, peptidoglycane et membrane externe).

Dans ces membranes, la rigidité du peptidoglycane (biopolymère) assure le maintien de la structure, de la pression osmotique interne et renforce l'imperméabilité aux molécules toxiques et aux antibiotiques. La membrane externe est riche en protéines et assure les échanges avec le milieu extérieur (canaux permettant l'entrée des nutriments et le rejet de macromolécules). Elle peut également avoir une fonction protectrice face aux agents chimiques et préserver la membrane plasmique qui est la cible de la plupart des antiseptiques et désinfectants [ref 8,9].

B) Culture et Préparation

B. 1. Milieu de culture

Deux méthodes de culture sont traditionnellement utilisées en microbiologie. La première se fait sur boîte de Pétri sur milieu gélosé, la seconde en milieu liquide (**Fig. IV.5**). Dans les deux cas, il existe différents milieux de culture dont la fonction première est d'être nutritif. On en utilise des différents suivant le type de bactérie, ses besoins et son environnement naturel.

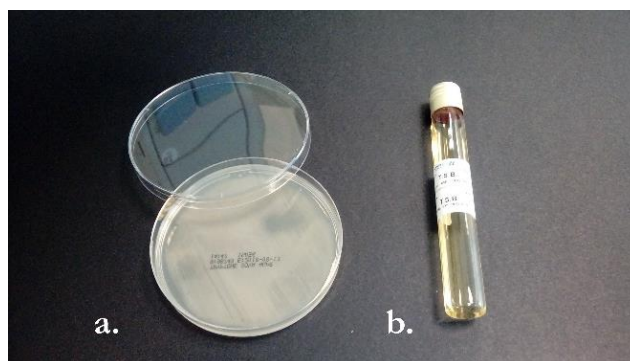


Fig. IV.5 – Milieux de cultures : gélose en boîte de Pétri (**a**) et milieu liquide (**b**). Exemple du milieu Trypticase soja utilisé dans nos laboratoires.

Le choix du milieu nutritif est également orienté par le but de l'étude (identification, comptage (dénombrement) ou antibiogramme). Il existe des milieux contenant des éléments spécifiques qui permettent d'identifier les propriétés des bactéries cultivées. Par exemple, des milieux gélosés contenant des colorants tels que l'éosine et le bleu de méthylène inhibent la croissance des bactéries à Gram positif et permettent donc de sélectionner les bactéries à Gram négatif. Les milieux contenant du sang ou du lactose permettent respectivement de détecter la production d'enzymes bactériennes permettant la dégradation des globules rouges ou du lactose. Il est également possible d'ajouter au milieu des agents dont le rôle est de générer un stress chez les bactéries cultivées, comme des antibiotiques. Cela permet de générer l'expression de certains gènes ou de favoriser une culture mono-microbienne.

B. 2. Conditions et temps de culture

Chaque bactérie possède un environnement optimal de croissance qui lui est propre. Outre la composition du milieu nutritif, les principaux paramètres de cet environnement sont la température, le pH et la présence (aérobie) ou l'absence (anaérobie) d'oxygène. Les bactéries se multiplient par division : la bactérie grandit (son ADN et ses constituants se dupliquent) puis se divise en deux cellules filles. On parle de croissance bactérienne pour l'accroissement des composants de la bactérie et de culture bactérienne pour l'augmentation du nombre de bactéries.

La croissance d'une bactérie est un phénomène non linéaire et limité dans le temps. Il existe différentes phases dont l'ensemble constitue sa courbe de croissance (**Fig. IV.6**).

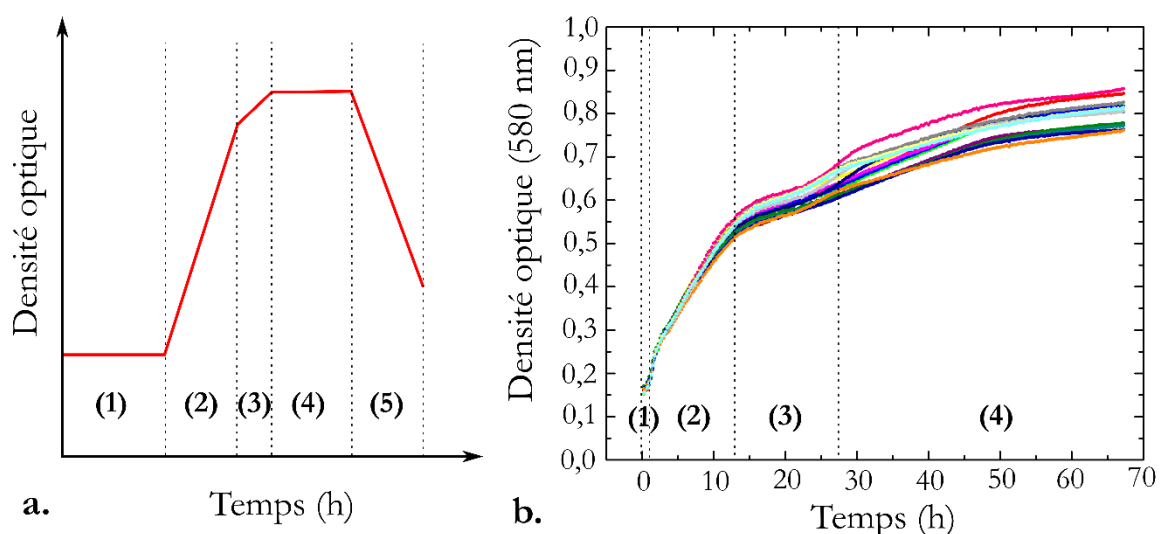


Fig. IV.6 – a. Schéma de la courbe de croissance d’une bactérie : (1) phase de latence, (2) phase de croissance exponentielle, (3) ralentissement de la croissance, (4) phase stationnaire, (5) phase de déclin. **b.** Exemple de la courbe expérimentale de croissance de la bactérie *E. Coli* pendant 70h sur une vingtaine d’échantillons en milieu nutritif Mueller Hinton 2.

La première (1) correspond à une phase de latence durant laquelle la bactérie produit les enzymes adaptées au nouveau milieu de culture. La seconde (2) est la phase de croissance exponentielle de la bactérie. Elle correspond à l’état optimal de croissance des bactéries, dont le temps de division est le plus court du cycle. Vient ensuite une phase de ralentissement de la croissance (3) due à l’appauvrissement du milieu et à l’accumulation des déchets. La croissance devient ensuite stationnaire (4) et le nombre de bactéries reste constant du fait des phénomènes de croissance et de lyse (destruction) bactérienne. La dernière phase est celle de déclin (5), lorsque toutes les ressources du milieu sont épuisées et que les bactéries sont lysées sous l’action des enzymes protéolytiques endogènes. Ces enzymes brisent les liaisons peptidiques des protéines et sont générées par les bactéries elles-mêmes. La durée des différentes phases de croissance des bactéries dépend des conditions de culture. Ce phénomène est illustré sur l’exemple de la bactérie *E. Coli* (ATCC 25922) cultivée dans ses conditions optimales dans notre laboratoire pendant 70h : température de 37°C, pH neutre, aérobie, milieu nutritif riche et phase de croissance exponentielle (**Fig. IV.6b**). On observe que la première phase a une durée de l’ordre de l’heure, la seconde de l’ordre d’une douzaine d’heures, la troisième de l’ordre d’une quinzaine d’heures et la phase stationnaire dure plus de 40h. La majorité des caractérisations de bactéries est effectuée lorsqu’elles sont en phase exponentielle (ou en ralentissement de croissance). Durant cette phase la variabilité des états est plus faible que dans l’ensemble des autres phases.

Comme évoqué au paragraphe précédent, la culture bactérienne peut être effectuée en milieu liquide ou sur milieu gélosé (Boîte de Pétri). Dans le premier cas le milieu est agité (mouvement de rotation) pendant le temps de culture afin d’éviter la formation de biofilms ou la sédimentation des bactéries. Elles poussent donc indépendamment les unes des autres et sont dites à l’état planctonique. Dans le second cas les bactéries vont se multiplier et croître sous forme de colonies. Ce sont des amas de cellules issues d’une unique bactérie qui s’est divisée au cours du temps. Elles sont liées entre elles par une matrice adhésive, nutritive et protectrice constituée de déchets métaboliques et d’une grande partie d’eau. Ces déchets sont des polysaccharides (peptidoglycanes, cellulose...) et peuvent être plus rarement des lipides et des protéines.

B. 3. Comptage de bactéries

Pour compter les bactéries d'un échantillon, on utilise l'unité ufc (Unité Formant Colonie) ou cfu (*Colony Forming Unit* en anglais). On compte le nombre de colonies après croissance (incubation 18h à 24h) pour connaître le nombre de bactéries cultivables que l'on avait initialement dans l'échantillon (cet échantillon est souvent liquide), il faut alors rapporter le nombre d'unités formant colonie au volume d'échantillon déposé initialement dans la boîte de Pétri. Cela nous permet de calculer la concentration en bactéries dans l'échantillon (en ufc/mL) et le nombre de bactéries initialement présentes dans l'échantillon. Il est souvent nécessaire d'effectuer une dilution du milieu dont on souhaite compter le nombre de bactéries. En effet la technique de comptage sur boîte de Pétri n'est valide que pour un nombre de bactéries par boîte compris entre 30 et 300 ufc. Cette technique est détaillée et illustrée (photos durant nos travaux) **Fig. IV.7**.

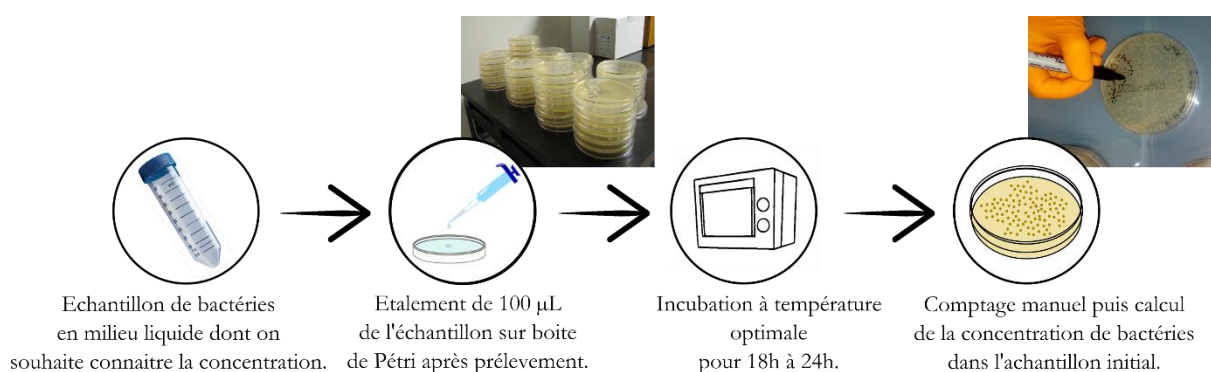


Fig. IV.7 – Principe de la méthode de comptage de bactéries sur boîtes de Pétri. Après préparation d'une suspension bactérienne, 100µL sont prélevés et étalés sur boîte de Pétri. Après 18 à 24h d'incubation le nombre de bactéries initialement cultivables dans la suspension bactérienne est compté manuellement.

Le comptage de bactéries à partir d'un échantillon liquide est contraignant car il nécessite l'utilisation d'une quantité importante de consommable (boîtes de Pétri, anses, milieux de dilution...) et est chronophage du fait du temps de culture nécessaire à la formation des colonies (18h-24h).

B. 4. Conclusion

Le **Paragraphe B** regroupe l'ensemble des éléments que j'ai utilisés durant ma thèse concernant la culture des bactéries et leur croissance. La technique de comptage qui permet de déterminer le nombre de bactéries cultivables dans un échantillon est également présentée et sera utilisée au **Chapitre VI**. L'ensemble de ces méthodes de microbiologie représente un temps de travail important, sans compter les périodes d'incubation. Les techniques que nous développons aujourd'hui visent à réduire ces échelles de temps. Cela peut être réalisé par le biais de l'étude d'un faible nombre de bactéries (étapes de culture et d'incubation en moins) ou de méthodes de caractérisation optiques (comptage et incubation en moins) par exemple.

C) Propriétés optiques

Les propriétés optiques des bactéries ont fait l'objet de peu d'études. Les paramètres d'absorbance, de diffusion et de diffraction qui décrivent la propagation de la lumière dans les cellules renseignent pourtant sur leurs propriétés morphologiques internes et globales. Le paramètre le plus important est l'indice optique. Il donne en effet accès à des informations sur les paramètres biochimiques (concentration de protéines, élasticité, conductivités, masses sèche) et sur le métabolisme (division) des bactéries [ref 10-12].

C. 1. Cellule bactérienne

C. 1. a. Méthodes

Plusieurs techniques permettent de déterminer l'indice moyen de cellules (forme végétative) ou de spores bactériennes, les principales sont la réfractométrie immersive (**Fig. IV.8**) et la microscopie interférentielle.

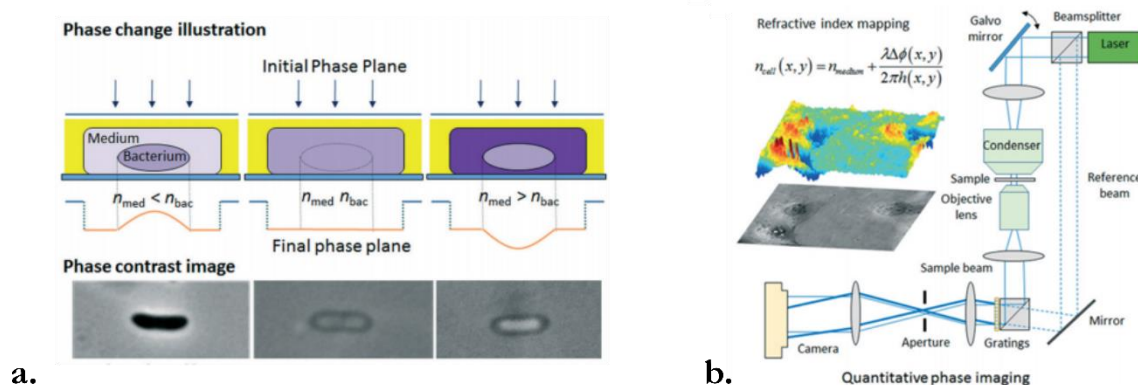


Fig. IV.8 – a. Principe de la méthode de mesure d'indice optique de bactéries par réfractométrie immersive. Extrait de [ref 10]. b. Cartographie d'indice optique mesurée par microscopie à contraste de phase. Extrait de [ref 10].

La première consiste à immerger des cellules dans des milieux d'indices différents et à les observer par microscopie à contraste de phase (transmission). Dans des milieux dont l'indice est équivalent à celui des bactéries en suspension, ces dernières ne sont plus visibles [ref 13-17]. Cette méthode permet de calculer l'indice optique avec une précision de l'ordre de 10^{-3} . La seconde consiste à étudier des suspensions bactériennes dans deux milieux d'indice différent par microscopie interférentielle. Le maximum de retard de phase mesuré permet de déterminer l'épaisseur et l'indice optique des bactéries. Cette méthode est utilisée pour la forme sporulée des bactéries car leur indice est trop important pour fabriquer des milieux aqueux d'indice équivalent [ref 10,13].

C. 1. b. Valeurs d'indice

Les valeurs d'indice obtenues grâce aux méthodes précédentes sont répertoriées dans le tableau **Fig. IV.9**. Elles sont dépendantes de la longueur d'onde utilisée, c'est pourquoi ce paramètre est également renseigné.

Bactéries	λ (nm)	Indice optique	Références
Forme végétative			
<i>Serratia marcescens</i>	546 nm	1,384	J. B. Bateman et al. [ref 18]
	589 nm	1,387 \pm 0,001	
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	546 nm	1,389	
	589 nm	1,399	
<i>Escherichia coli</i>	546 nm	1,401	P.Y. Liu et al [ref 16]
	589 nm	1,406 \pm 0,003	
<i>Shigella flexneri</i>	514 nm	1,388 \pm 0,005	
<i>Vibrio cholera</i>		1,422 \pm 0,005	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	542 nm	1,365 \pm 0,005	K. F. A Ross [ref 19]
<i>Bacillus cereus</i>		1,403 - 1,413	
<i>Bacillus megaterium</i>		1,3845 - 1,3880	
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>		1,3830 - 1,3920	
		1,3960 - 1,4030	K. F. A Ross et al. [ref 13]
Forme sporulée			
<i>Bacillus cereus</i>	542 nm	1,466 - 1,579	K. F. A Ross et al. [ref 13]
<i>Bacillus megaterium</i>		1,537 - 1,540	
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>		1,519 - 1,528	
<i>Bacillus subtilis</i>	400 - 1000 nm	1,39 – 1,51	A. Katz et al [ref 20]

Fig. IV.9 – Indice moyen de formes végétatives et de formes sporulées de divers bactéries. Ces données sont extraites des références citées et sont valables aux longueurs d'onde renseignées.

Nous déduisons de ces résultats que l'indice des bactéries étudiées est compris entre **1,365** et **1,422** pour la forme végétative des bactéries et entre **1,466** et **1,579** pour la forme sporulée. La différence d'indice entre ces deux formes peut s'expliquer par la part d'eau et de matière sèche (« solid content ») qu'elles contiennent. K. F. A Ross and E. Billing [ref 13] ont ainsi évalué que la part d'eau est au moins deux fois plus importante que la part de matière sèche (en g/100mL) dans la forme végétative des bactéries *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* var. *mycoides* et *Bacillus subtilis*. Pour la forme sporulée ils observent le phénomène inverse : la part de matière sèche est au moins quatre fois plus importante que la part d'eau pour ces mêmes bactéries.

C. 2. Membrane bactérienne

La membrane bactérienne est un paramètre clé de ces êtres unicellulaires. Elle occupe un rôle central dans la toxicité [ref 21], la mobilité [ref 22] et les propriétés mécaniques [ref 23,24] des bactéries. S'il existe de nombreuses méthodes de caractérisation optique des différents composants d'une cellule [ref 10,25-29], ce n'est pas le cas pour les bactéries. En première approximation, les propriétés optiques de la membrane bactérienne sont parfois assimilées à celles du matériel nucléaire des cellules [ref 30]. A notre connaissance, seuls les travaux de Robert E. Marquis [ref 31] qui datent de 1973 ont permis de déterminer une valeur d'indice optique pour la membrane de bactéries à Gram positif. L'isolement des membranes bactériennes est réalisé selon le procédé suivant : les bactéries sont d'abord chauffées 1 minute à 70°C pour détruire les enzymes autolytiques susceptibles de dégrader le peptidoglycane des membranes. Elles sont ensuite mises

en agitation avec des billes de verre afin de détruire leur membrane. Enfin, une étape de centrifugation suivie d'un lavage et d'une purification permet d'isoler les membranes. Elles sont ensuite mises en suspension dans des milieux d'indice variable (concentration en BSA variable) et leur indice est évalué par réfractométrie immersive comme présenté précédemment. Les résultats de cette étude sont présentés **Fig. IV.10** sur huit bactéries. La valeur prédictive d'indice optique est calculée à partir de l'évaluation de la part de matière solide dans la membrane, en l'assimilant aux polymères qui la composent.

Organism	Dextran-impermeable volume (ml/g)	Predicted refractive index ^a	Refractive index determined by immersion refractometry
<i>S. aureus</i> 52A5	3.8	1.380	1.382
<i>S. aureus</i> Duncan	5.1	1.368	1.370
<i>S. faecalis</i> 9790	5.3	1.367	1.369
<i>S. aureus</i> H	6.6	1.360	1.356
<i>A. crystallopoietes</i> (spherical form)	8.3	1.355	1.356
<i>M. lysodeikticus</i> 4698	8.4	1.354	1.353 1.357 ^b
<i>B. megaterium</i> KM	10.1	1.351	1.351 1.351 ^b
<i>A. crystallopoietes</i> (rod form)	11.1	1.349	1.348

Fig. IV.10 – Indice de membranes de bactéries à Gram positif évalué par réfractométrie immersive, extrait des travaux de R. E. Marquis [ref 31]. La longueur d'onde utilisée est de 700 nm.

Finalement, l'indice optique de la membrane bactérienne n'a été évalué que dans le cas spécifique de bactéries à Gram positif, dégradées de manière thermique et mécanique.

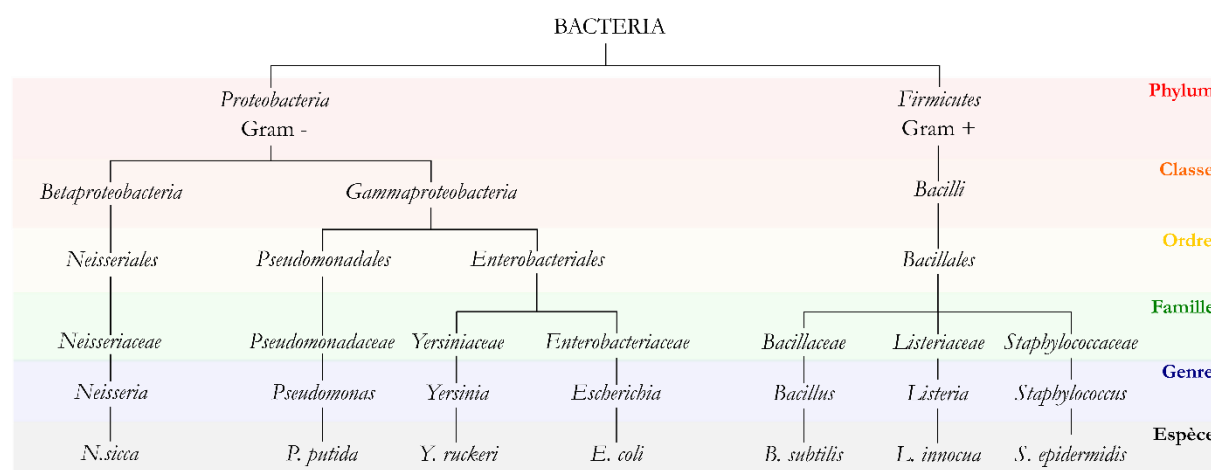
C. 3. Conclusion

La technique de réfractométrie immersive est la plus utilisée pour déterminer l'indice optique des cellules bactériennes et de leur membrane. Nous pouvons déduire de l'ensemble des travaux étudiés que l'indice des bactéries est compris entre **1,365** et **1,422** pour les cellules végétatives et que celui de leur membrane est compris entre **1.351** et **1.382**. En première approximation, si on néglige le phénomène de dispersion (dépendance de l'indice de l'objet à la longueur d'onde), on observe sur le *Bacillus megaterium* une valeur d'indice moyen compris entre 1,537 et 1,540 pour les spores, entre 1,3830 et 1,3920 pour les cellules végétatives et autour de 1,351 pour leur membrane. La membrane des bactéries à Gram positif aurait donc un indice optique inférieur à celui de leur indice global.

D) Bactéries étudiées

D. 1. Description générale

Au cours de ma thèse nous avons travaillé uniquement avec des bactéries non-pathogènes (classe 1) afin de respecter les règles de sécurité du laboratoire de physique dans lequel se trouve le dispositif de piégeage. Ces bactéries, ainsi que leurs propriétés et leur lien phylogénétique sont listés **Fig. IV.11**.



Genre	Espèce	Souche	Nom	Taille	Forme	Gram	Mobilité
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	ATCC 11775 ATCC 25922	EC28 EC10	1 x 2 µm	Bacille	(-)	Péritriche
<i>Yersinia</i>	<i>Y. ruckeri</i>	ATCC 29473	YR137	1 x 2 µm	Bacille	(-)	/
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>	ATCC 12633 ATCC 31483	PP6 PP46	1 x 2 µm	Bacille	(-)	Monotriche
<i>Listeria</i>	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	LI142	1 x 2 µm	Bacille	(+)	Amphitriche
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	ATCC 11774	BS134	1 x 3 µm	Bacille	(+)	Péritriche
<i>Neisseria</i>	<i>N. sicca</i>	ATCC 29193	NS139	1 µm	Coque	(-)	/
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990 ATCC 12228	SE9 SE26	1 µm	Coque	(+)	/

Fig. IV.11 – Bactéries étudiées, lien phylogénétique et propriétés. La souche, le nom que nous leur associons, leur taille, forme type de Gram et leur mobilité sont également présentés.

Nous avons choisi d'étudier ces sept espèces bactériennes pour leurs différences en morphologie, en composition et en mobilité. Elles sont également biologiquement proches d'espèces pathogènes (*L. innocua* pour *L. monocytogenes* et *Y. ruckeri* pour *Y. enterocolitica* par exemple) et sont représentatives des quatre principales catégories de bactéries pathogènes : coques Gram-positifs (*S. epidermidis*), coques Gram-négatifs (*N. sicca*), bacilles Gram-positifs (*B. subtilis* and *L. innocua*) et bacilles Gram-négatifs (*E. coli*, *Y. ruckeri* and *P. putida*).

D. 2. Préparation des échantillons

Les différentes souches bactériennes que nous utilisons sont des souches de référence (ATCC) achetées sous forme lyophilisées (KwikStik, Microbiologics, St. Cloud, MN). Elles sont cultivées sur milieu gélosé (boîtes de Pétri) de type COS (Columbia Blood Agar) ou TSA (Tryptic Soy Agar). Le milieu COS est plus riche que le TSA et il contient du sang de mouton, ce qui permet de tester la capacité hémolytique de certaines souches de bactéries. Après 24h d'incubation à 37°C quelques colonies sont prélevées sur les boîtes de culture et mises en suspension dans de l'eau déionisée filtrée à 0,2 µm. La concentration en bactéries dans le milieu est mesurée (densité optique) afin d'obtenir suivant les applications 0,5 McF à 3 McF (ce qui correspond à une concentration d'environ 2.10^8 à 2.10^9 cfu/mL pour des bacilles de type *E. coli*).

D. 3. Caractérisation en microscopie électronique à balayage (MEB)

Des images en microscopie électronique à balayage (MEB) des bactéries présentées dans le paragraphe précédent ont été réalisées. La méthode globale de préparation des échantillons est la suivante : une suspension bactérienne à 0,5 McF est réalisée dans de l'eau déionisée et filtrée (0,2 µm), à partir d'une culture bactérienne en boîte de Pétri (milieu COS ou TSA). Une goutte est ensuite déposée sur un morceau de wafer de silicium préalablement nettoyé. Elle est ensuite évaporée à température ambiante ou sur une plaque chauffante à une température n'excédant pas 37°C (chauffage pulsé). Une métallisation (dépôt d'or) peut être effectuée sur le morceau de silicium avant ou après dépôt des bactéries.

L'ensemble des images MEB ont été réalisées avec un détecteur HE-SE2 (*High Efficiency Secondary Electron*), récupérant à la fois les électrons secondaires et les électrons rétrodiffusés. Nous travaillons à faible tension d'accélération des électrons (1,20 kV) pour éviter que le substrat silicium ne charge trop. Lorsque le substrat est métallisé (or), cela est moins contraignant car la conductibilité électrique de la couche métallique est suffisante pour assurer l'écoulement des charges superficielles et obtenir une image de qualité. D'après nos observations les bactéries présentent une bonne résistance au vide poussé de la chambre d'observation ($<10^{-5}$ mbar), avec et sans métallisation.

1. Bactéries imagées sans métallisation

Sur la **Fig. IV.12**, on peut observer les bactéries imagées sans métallisation, c'est-à-dire évaporées à même le silicium. Cette technique permet d'avoir une bonne information sur la forme et l'aspect externe des bactéries, sans modification liée à un dépôt de métal sur les bactéries. Les flagelles sont visibles sur les bactéries à flagellation péritriche (*E. coli* et *B. subtilis*) du fait du grand nombre de flagelles qu'elles possèdent, mais ne le sont pas sur les bactéries à flagellation monotriche (*P. putida*) ou amphitriche (*L. innocua*). De manière générale les flagelles sont fragiles et ils sont souvent arrachés des bactéries lors de l'évaporation de la goutte (tension de surface trop importante). Pour certaines d'entre elles on observe également des restes de matrice polysaccharidique à la surface du silicium (*Y. ruckeri*).

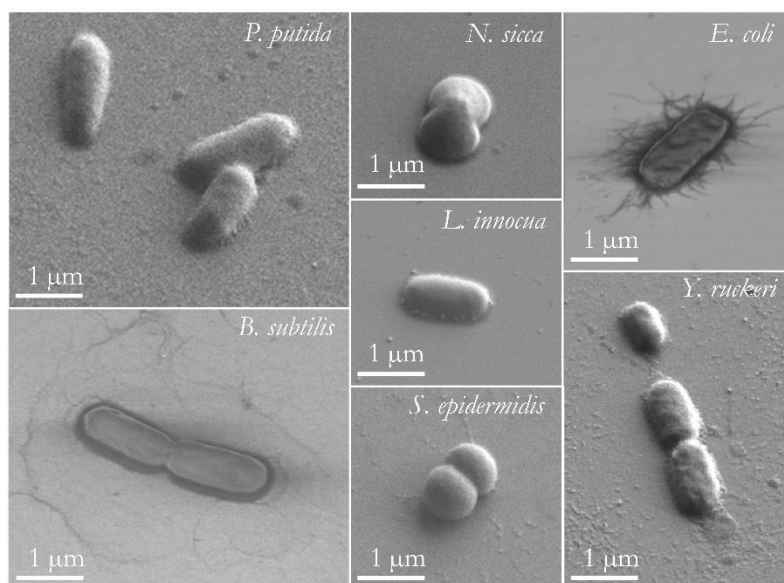


Fig. IV.12 – Images MEB sans métallisation des sept bactéries étudiées : *P. putida* (PP6), *N. sicca* (NS139), *E. coli* (EC28), *B. subtilis* (BS134), *L. innocua* (LI142), *S. epidermidis* (SE26) et *Y. ruckeri* (YR137), observation sur échantillon silicium non métallisé.

2. Bactéries métallisées (Or)

Sur la **Fig. IV.13a**, on peut observer les bactéries *E. coli*, *S. epidermidis* et *B. subtilis* après un dépôt d'or d'une épaisseur de 10 nm. Ce dépôt a été effectué après l'évaporation de la goutte de suspension bactérienne sur morceau de silicium et recouvre donc les bactéries. Cette méthode permet de visualiser très précisément la forme des bactéries et leurs flagelles. Elle ne permet cependant pas l'observation de l'aspect externe des bactéries car le dépôt d'or masque les détails fins et présente des craquelures. Il amplifie aussi le volume des restes de matrice polysaccharidique visibles sur l'image de *B. subtilis*. L'épaisseur du dépôt d'or ne doit pas être trop importante sous peine de masquer complètement les bactéries (exemple d'un dépôt de 40 nm d'or **Fig. IV.13b**).

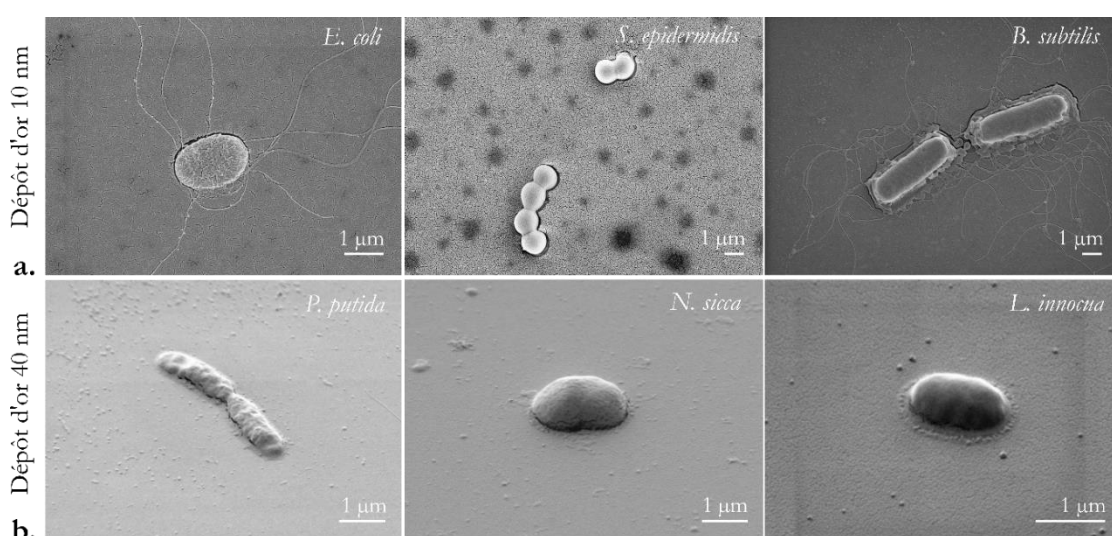


Fig. IV.13 – **a.** Images MEB avec dépôt d'or (10 nm) après évaporation des suspensions de bactéries *E. coli* (EC28), *S. epidermidis* (SE26) et *B. subtilis* (BS134). **b.** Images MEB avec dépôt d'or (40 nm) après évaporation des suspensions de bactéries *P. putida* (PP6), *N. sicca* (NS139) et *L. innocua* (LI142).

3. Support métallisé (Or)

Une dernière possibilité consiste à ne métalliser que le substrat silicium afin de le rendre moins isolant (**Fig. IV.12**). L'épaisseur du dépôt d'or a alors peu d'influence. La qualité de visualisation des détails des bactéries est maximale : elle nous permet de visualiser distinctement les flagelles (*E. coli*, *L. innocua*), la forme et la texture de la membrane bactérienne. L'enrobage des Coques *S. epidermidis* que l'on observe **Fig. IV.14** peut être lié à des restes de matrice polysaccharidique ou à une contamination du milieu de suspension.



Fig. IV.14 – Images MEB avec substrat métallisé (or) avant évaporation des suspensions de bactéries *E. coli* (EC28), *S. epidermidis* (SE26) et *L. innocua* (LI142).

Lors de nos différentes études, nous avons principalement étudié les propriétés membranaires des bactéries. Dans un souci de déterminer avec précision leur forme, leur texture et leurs flagelles nous avons donc privilégié les méthodes d'observation **avec métallisation du substrat uniquement** ou **sans métallisation**.

E) Agents antibactériens

Il existe différents moyens de lutter contre les bactéries, qu'elles soient responsables d'une infection du corps humain ou de la contamination de denrées alimentaires. Ils sont principalement physiques (filtration, rayonnement, température) et chimiques (savon, détergent, oxydants, alcool ou antibiotiques). Différentes stratégies sont utilisées suivant les micro-organismes visés, leur environnement et l'intensité de l'action souhaitée. On distingue les antiseptiques et les désinfectants qui ont pour but de limiter la croissance ou de tuer les micro-organismes. Les premiers désignent des produits que l'on applique sur les tissus vivants et les seconds ceux que l'on applique sur les matériaux inertes (sols, matériel médical). La stérilisation est un procédé qui consiste à détruire les germes microbiens dans un échantillon ou sur un instrument.

E. 1. Agents physiques

E. 1. a. Filtration

La filtration est un procédé mécanique qui permet d'éliminer les bactéries d'un milieu liquide. La taille des pores des filtres utilisés est variable (0,1 – 10 µm) et dépend des micro-organismes à filtrer. Classiquement, on utilise des filtres à 0,2 µm pour éliminer les bactéries avec lesquelles nous travaillons et dont la dimension la plus faible est de l'ordre du micron.

E. 1. b. Rayonnement ionisant

Les rayonnements Gamma (Cobalt 60 ou Césium 137) sont des rayonnements électromagnétiques de grande énergie fortement ionisants qui permettent d'arracher des électrons aux atomes. Ils peuvent être utilisés pour détruire les micro-organismes d'un échantillon ou sur du matériel. Au niveau des bactéries, les radiations causent des dommages irréversibles : altération des bases des acides nucléiques (ADN) et rupture des liaisons hydrogènes des molécules protéiques [ref 32].

E. 1. c. Température

La température est un paramètre clé du développement bactérien. Chaque type de bactérie possède une température optimale de croissance. C'est dans les températures supérieures à cette température que les bactéries sont les plus vulnérables. Cette sensibilité est exploitée dans les procédés de pasteurisation et de stérilisation. La différence entre ces deux techniques concerne la destruction des formes des micro-organismes : la pasteurisation ne vise que la forme végétative tandis que la stérilisation (qui a lieu à plus haute température) vise les formes végétatives et sporulées des micro-organismes. Sur l'exemple du lait le procédé de pasteurisation consiste à le chauffer quinze à vingt secondes à une température comprise entre 62°C et 90 °C, tandis que la stérilisation Ultra Haute Température (UHT) consiste à le chauffer pendant 1 à 3 secondes à des températures comprises entre 130°C et 150°C [ref 33].

Le stress causé par une élévation de la température se traduit entre autre par l'accumulation d'espèces réactives oxygénées ERO (ROS pour *Reactive Oxygen Species* en anglais) dans la cellule, altérant leur viabilité [ref 34-36].

E. 2. Agents chimiques

E. 2. a. Savons et détergents

Les savons et détergents ont principalement une action mécanique : ils décollent les bactéries des surfaces, les emprisonnent dans la mousse et elles sont ensuite évacuées par rinçage.

E. 2. b. Oxydants

Les principaux oxydants utilisés pour l'élimination de bactéries sont l'eau oxygénée, le chlore et ses dérivés (hypochlorite de sodium ou eau de Javel). L'action de ces espèces oxydantes est similaire à celle de la température. Lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est supérieure aux capacités antioxydantes de la cellule, cela cause des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides entraînant son vieillissement prématuré et sa destruction [ref 36,37].

E. 2. c. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances dérivées de molécules naturelles qui peuvent aujourd'hui être produites de manière synthétique. Ils possèdent deux modes d'action : ils sont dits *bactéricides* lorsqu'ils détruisent les bactéries et *bactériostatiques* lorsqu'ils bloquent leur croissance. Ces modes d'action dépendent du type d'antibiotique et de la dose utilisée.

Ils agissent spécifiquement sur les bactéries, en bloquant une étape essentielle de leur développement telle que la synthèse de leur paroi, des protéines, de l'ADN ou de la production d'énergie. Pour cela, la molécule de l'antibiotique se fixe sur sa cible, une molécule de la bactérie qui participe à une étape d'un mécanisme essentiel à sa survie ou à sa multiplication.

Il existe différents types de mécanismes d'action des antibiotiques. Ils peuvent inhiber la synthèse de la paroi bactérienne, la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) ou la synthèse protéique. Ils peuvent également avoir une action sur la membrane bactérienne en détruisant son intégrité, laissant échapper les éléments hydrosolubles de la cellule ou favoriser la formation de pores cylindriques permettant la fuite des cations [ref 38].

F) Diagnostic bactérien

Le diagnostic bactérien est un examen classique en milieu hospitalier. Il a pour objectif d'identifier la bactérie responsable de l'infection du patient et de trouver un antibiotique susceptible de la stopper. Dans le cas des prélèvements liquides, le temps et les méthodes de diagnostic peuvent varier suivant le type d'échantillon (sang, urine, liquide céphalo-rachidien, liquide articulaire) et les méthodes de diagnostic. Les étapes de la méthode de diagnostic la plus répandue jusque dans les années 2000 sont détaillées Fig. IV.15. Certaines peuvent être automatisées mais la majorité des étapes était alors effectuée manuellement [ref 39].

J0		J1			J2/3	
Examen direct	Mise en culture	Examen des cultures : tests présomptifs Gram-oxydase-catalase	Mise en route de l'identification	Mise en route de l'antibiogramme	Lecture des tests d'identification et des tests d'antibiogramme	Tests complémentaires (Agglutination-CMI)
Manuel		Manuel	Manuels ou automatisés		Manuelle / automatisée	Manuels

Fig. IV.15 – Gestion bactériologique d'un prélèvement standard [ref 39]. Les étapes du diagnostic peuvent être effectuées manuellement ou à l'aide d'un automate.

Une fois le prélèvement effectué, un examen direct est réalisé [ref 40]. Il est divisé en deux étapes : l'examen à l'état frais et l'examen après coloration. La première de ces deux étapes consiste à observer l'échantillon au microscope entre lame et lamelle et permet d'extraire de l'information sur la morphologie et la mobilité des bactéries. La seconde consiste à utiliser des colorations afin de déterminer le type de Gram par exemple. Cet examen direct permet d'extraire des informations de première importance pour la suite de l'identification. Il permet également d'évaluer de manière grossière la quantité de bactéries dans le prélèvement, donnant des informations sur l'ampleur de l'infection. Les étapes d'identification et d'antibiogramme sont ensuite effectuées sur l'échantillon qui a été mis en culture (18-24h).

Aujourd'hui d'autres méthodes de diagnostic sont utilisées pour la majorité des analyses en milieu hospitalier. Ces méthodes sont quasiment entièrement automatisées et concernent principalement l'étape d'identification bactérienne (spectroscopie de masse, tests biochimiques ou tests ADN).

F. 1. Identification

L'identification bactérienne était (et reste parfois) réalisée grâce au cheminement le long d'un arbre décisionnel fondé sur des critères de morphologie de colonie (taille, pigmentation), sur le type de Gram, la capacité hémolytique des bactéries (destruction des globules rouges), le métabolisme respiratoire (aérobie/anaérobie) et sur des caractères biochimiques tels que la catalase ou l'oxydase. Ce processus d'identification est détaillé en [annexe 2](#). Selon les résultats de ces caractérisations préliminaires, les méthodes d'identification sont variables : techniques d'agglutination et biochimiques pour *Staphylocoques* et *Streptocoques* ou génomique pour *Chlamydia* et les mycobactéries par exemple [\[ref 39\]](#).

Depuis quelques années, l'utilisation de dispositifs de spectroscopie de masse (MALDI-TOF) en milieu hospitalier permet l'identification de bactéries en une journée. Les bactéries sont cultivées puis volatilisées avant l'analyse de leurs protéines. Une banque de données permet d'identifier l'espèce bactérienne étudiée. La quantité de bactéries requise pour une analyse reste cependant élevée pour ce type de dispositif : de l'ordre de 10^5 à 10^7 . De plus le prix de ces équipements limite son utilisation aux groupes hospitaliers.

F. 2. Susceptibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme accompagne quasiment systématiquement l'identification des bactéries. Il est principalement réalisé par diffusion et doit suivre les recommandations annuelles du CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) sur des critères tels que le choix des antibiotiques à tester selon la bactérie identifiée, le milieu à utiliser, la température, le temps d'incubation et l'environnement [\[ref 41\]](#). Des disques imbibés de différents antibiotiques à différentes concentrations sont déposés sur des milieux gélosés sur lesquels les bactéries ont été préalablement mises en culture. Après un temps d'incubation de 18h à 24h à 35-37°C, les résultats (diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques, illustration **Fig. IV.16a**) sont à interpréter à l'aide de la dernière version de l'ouvrage intitulé « l'Antibiogramme » [\[ref 42\]](#). Il existe également des bandelettes imbibées sur lesquelles on peut directement lire la concentration minimale inhibitrice de la croissance des bactéries. Ce sont ces dispositifs que nous utilisons principalement dans nos laboratoires (**Fig. IV.16b-c**). Ces méthodes autorisent un certain degré d'automatisation, notamment pour les étapes de lecture.

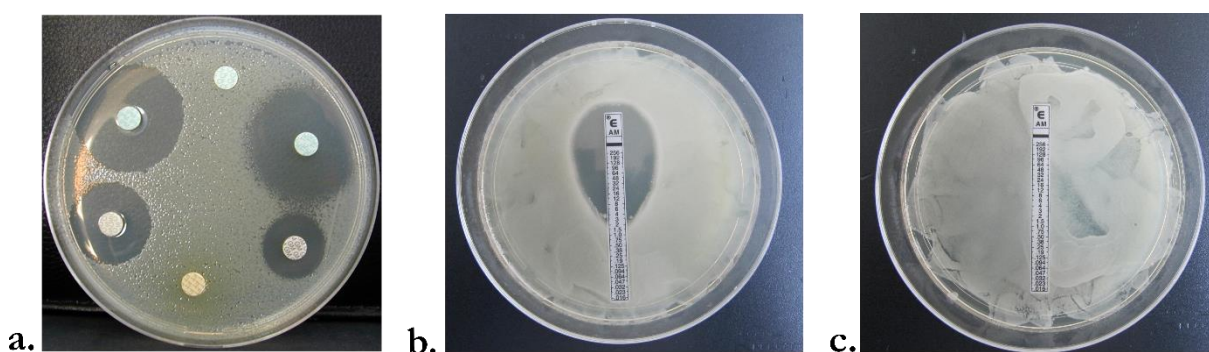


Fig. IV.16 – Antibiotogrammes circulaires (a) ou à bandelette (b-c). a. Test effectué sur *Pseudomonas aeruginosa*, extrait de [\[ref 43\]](#). Les bactéries sont sensibles à quatre antibiotiques et résistantes à deux. B. Tests effectués dans nos laboratoires d'ampicilline sur deux souches d'*E. coli*, l'une sensible (b), l'autre résistante (c).

F. 3. Conclusion

Le diagnostic bactérien est un procédé complexe qui requiert au minimum 48h et une main d'œuvre qualifiée. L'automatisation de certaines étapes a déjà commencé en milieu hospitalier mais reste ponctuelle et associée à des étapes spécifiques, ne permettant pas de diminuer significativement la durée totale du diagnostic. Ce sont les étapes de culture qui sont les plus chronophages car les étapes d'identification et d'antibiogramme nécessitent un isolement et un grand nombre de bactéries. Afin de réduire de manière significative le temps de diagnostic, il convient de développer des méthodes d'identification et d'antibiogramme qui nécessitent un nombre restreint de bactéries. Il serait idéal de pouvoir réaliser ces étapes directement sur l'échantillon prélevé sur le patient.

G) Conclusion

Ce quatrième chapitre permet d'introduire les bactéries qui sont au cœur de nos travaux. Nous y décrivons leurs caractéristiques morphologiques, optiques et indiquons les méthodes traditionnelles de culture utilisées en laboratoire de microbiologie. Les sept types de bactéries avec lesquelles nous avons travaillé durant ce doctorat sont présentés de manière plus détaillée : *E. coli*, *Y. ruckeri*, *P. putida*, *L. innocua*, *B. subtilis*, *N. sicca*, *S. epidermidis*. Des images de microscopie électronique à balayage (MEB) viennent compléter cette description.

Les principaux agents antibactériens sont ensuite décrits et les méthodes traditionnelles de diagnostic en milieu hospitalier sont présentées. Ce diagnostic est décomposé en deux étapes : la première est une étape d'identification de la bactérie responsable de l'infection et la seconde une étape de recherche de l'antibiotique susceptible de la stopper. Cette problématique du diagnostic bactérien est celle que nous avons souhaité adresser pendant nos travaux. Les cristaux photoniques nous apparaissent comme des outils adaptés à la caractérisation fine des bactéries. Ils présentent l'avantage d'autoriser l'étude d'une bactérie unique, permettant de travailler à faible concentration de bactéries. Leur utilisation est donc prometteuse pour des applications de diagnostic rapide, en s'affranchissant des étapes de culture bactérienne. Les chapitres suivants présentent les résultats que nous avons obtenus en matière d'identification de bactéries (**Chapitre V**) et de susceptibilité à un agent antibactérien (**Chapitre VI**).

Références :

- [1] *Soil genomics*. B. K. Singh, C. D. Campbell, S. J. Sorenson and J. Zhou, *Nature Reviews Microbiology* **7**, 756 (2009).
- [2] *Bactéries pathogènes, hôtes, et environnement : une approche multifactorielle pour l'étude de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie*. Cyrille Goarant, *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc (2010).
- [3] *Turbidity Changes in Bacterial Suspensions in relation to Osmotic Pressure*. J. Mager, M. Kuczynski, G. Schatzberg and Y. Avi-Dor, *J. gen. Microbial.* **14**, 69-75 (1956).
- [4] *Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors*, J.M. Wood. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 1, 230-262 (1999).
- [5] *The bacterial cell envelope*. T. Silhavy, D. Kahne, & S. Walker, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–16 (2010).
- [6] *Prescott', Harley & Klein's Microbiology*. J. Willey, L. Sherwood, & C. J. Woolverton, Mc Graw Hill, (2008).
- [7] *Use of the Gram stain in microbiology*. T. J. Beveridge, *Biotech. Histochem.* **76**, 111–118 (2001).
- [8] *Environnement des bacteries et sensibilité aux biocides*. A. Allion, *Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires* (2004).
- [9] *La résistance microbienne à l'action des antiseptiques et désinfectants, Antisepsie et désinfection*. B. Joly, J. Fleurette, J. Freney et M. E. Reverdy (Eds), *Editions Eska*, p52-65 (1995).
- [10] *Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future*. P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, H. F. Chen, C.-M. Hsieh, C.-H. Lee, K.-B. Sung, T. C. Ayi, , P. H. Yap, B. Liedberg, K. Wang, T. Bourouina and Y. Leprince-Wang, *Lab Chip* **16**, 634-644 (2016).
- [11] *Determination of the Biomasses of Small Bacteria at Low Concentrations in a Mixture of Species with Forward Light Scatter Measurements by Flow Cytometry*. B. R. Robertson, D. K. Button, and A. L. Koch, *Appl Environ Microbiol* **64**, 10, 3900–3909 (1998).
- [12] *Refractive-Index-Based Screening of Membrane-Protein-Mediated Transfer across Biological Membranes*. Magnus Brändén, Seyed R. Tabaei, Gerhard Fischer, Richard Neutze, and Fredrik Höök, *Biophysical Journal* **99**, 1, 124-133 (2010).
- [13] *The Water and Solid Content of Living Bacterial Spores and Vegetative Cells as Indicated by Refractive Index Measurements*. K. F. A. Ross and E. Billing, *J. gen. Microbiol.* **16**, 418-425 (1957).
- [14] *Spectrophotometric determination of refractive index increment for bacterial cells*. T. R. Corner, T. C. Beaman, J. T. Greenamyre and P. Gerhardt, *Journal of Microbiological Methods* **11**, 255-260 (1990).
- [15] *Real-time Measurement of Single Bacterium's Refractive Index Using Optofluidic Immersion Refractometry*. P. Y. Liu, L.K. Chin, W. Ser, T. C. Ayi, P. H. Yap, T. Bourouina and Y. Leprince-Wang, *Procedia Eng.* **87**, 356-359 (2014).

- [16] *An optofluidic imaging system to measure the biophysical signature of single waterborne bacteria*, P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, T. C. Ayi, P. H. Yap, T. Bourouina and Y. Leprince-Wang, *Lab Chip* **14**, 4237 (2014).
- [17] *Refractometry of living cells*. R. Barer, K. F. A. Ross and S. Tkaczyk, *Nature* **171** (1953).
- [18] *Refraction and absorption of light in bacterial suspensions*. J. B. Bateman, J. Wagman and E. L. Carstensen, *Kolloid-Z. Polym.* **44**, 208 (1966).
- [19] *The size of Living Bacteria*. K. F. A. Ross, *Quarterly Journal of Microscopical Science* **98**, 4, 435-454 (1957).
- Fikhman, B. A., *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* **49**, 60-65 (1963).
- [20] *In situ determination of refractive index and size of Bacillus spores by light transmission*. Katz A, Alimova A, Xu M, Gottlieb P, Rudolph E, Steiner JC, Alfano RR. *Opt Lett.* **30**, 6, 589-591 (2005).
- [21] *Toxic Properties of the Cell Wall of Gram-Positive Bacteria*. G. S. Schuster, J. A. Hayashi and A. N. Bahn, *J. Bacteriol.* **93**, 47-52 (1967).
- [22] *Motile Behavior of Bacteria*. H. C. Berg, *Physics Today* **29**, 24-29 (2000).
- [23] *Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties*. R. J. Doyle and R. E. Marquis, *Trends in Microbiology* **2**, 57-60 (1994).
- [24] *Mechanical properties of Bacillus subtilis cell walls: effects of ions and lysozyme*. J. J. Thwaites and U. C. Suranat, *J. Bacteriol.* **173**, 197-203 (1991).
- [25] *Integrated dual-tomography for refractive index analysis of free-floating single living cell with isotropic superresolution*. B. Vinoth, X.-J. Lai, Y.-C. Lin, H.-Y. Tu & C.-J. Cheng, *Scientific reports* **8**, 5943 (2018).
- [26] *Tomographic flow cytometry by digital holography*. F. Merola, P. Memmolo, L. Miccio, R. Savoia, M. Mugnano, A. Fontana, G. D'Ippolito, A. Sardo, A. Iolascon, A. Gambale and P. Ferraro, *Light Sci Appl.* **6**, e16241 (2017).
- [27] *Full-angle tomographic phase microscopy of flowing quasi-spherical cells*. M. M. Villone, P. Memmolo, F. Merola, M. Mugnano, L. Miccio, P. L. Maffettone and P. Ferraro, *Lab on a Chip* **18**, 126-131 (2018).
- [28] *Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude microscopy and confocal microscopy*. C. L. Curl, C. J. Bellair, T. Harris, B. E. Allman, P. J. Harris, A. G. Stewart, A. Roberts, K. A. Nugent, and L. M. Delbridge, *Cytometry* **65A**, 88-92 (2005).
- [29] *Tomographic phase microscopy*. W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari & M. S. Feld, *Nature Methods* **4**, 717-719 (2007).
- [30] *Bacteria Size Determination by Elastic Light Scattering*. A. Katz, Alexandra Alimova, Min Xu, Elizabeth Rudolph, Mahendra K. Shah, Howard E. Savage, Richard B. Rosen, Steven A. McCormick, and Robert R. Alfano, *IEEE Journal Of Selected Topics In Quantum Electronics* **9**, 2, 277-287 (2003).

- [31] *Immersion Refractometry of Isolated Bacterial Cell Walls*. R. E. Marquis, *Journal of Bacteriology*, 1273-1279 (1973).
- [32] *La stérilisation par les radiations ionisantes dans le domaine médical*. J. Fleurette, *J. Lyon Medical*, **232** 13, 5-8 (1974).
- [33] *MILK | Processing of Liquid Milk*. J. Manners and H. Craven, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), 3951-3957 (2003).
- [34] *Mechanism to control the cell lysis and the cell survival strategy in stationary phase under heat stress*. R. Noor, *SpringerPlus* **4**, 599 (2015).
- [35] *Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens*. A. M. Wesche, J. B. Gurtler, B. P. Marks, and E. T. Ryser, *Journal of Food Protection* **72**, 1121-1138 (2009).
- [36] *Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant*. Camille Migdal, Mireille Serres, *m/s* **4**, 405 (2011).
- [37] *L'eau de javel et les bactéries, Identification d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle*. Benjamin Ezraty, Frédéric Barras, *Med Sci (Paris)* **32**, 542–544 (2016).
- [38] *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*, Michael A. Kohanski, Daniel J. Dwyer and James J. Collins, *Nature Reviews Microbiology* **8**, 423–435 (2010).
- [39] *L'automatisation en bactériologie : un challenge continu. L'expérience du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble*. J. Croize, C. Recule, I. Pelloux, V. Chanteperdrix et M. Maurin, *Spectra Biologie* 160 (2007).
- [40] *La place de l'examen direct des prélèvements bactériologiques dans le diagnostic des infections bactériennes*. T. Rasamiravaka, M. Dessay, S. Nirry Manantsoa, A. Olivat Rakoto-Alson et A. Rasamindrakotroka, *Bio trib. mag.* **41**, 1, 13-17 (2011).
- [41] *CASFM, Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Communiqué 2007. Editions SFM, www.sfm.asso.fr/.
- [42] *Antibiogramme*. P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen, 2^e édition, *Editeur ESKA*, Paris (2006).
- [43] http://blinks3.free.fr/d_1eS/genetique_sante/05/FT_antibiogramme/antibiogramme.html. *Principe de l'antibiogramme*. Consulté en septembre 2018.

V. Identification de bactéries piégées

A) Étude comportementale et identification

- A. 1. Caractérisation spatiale
 - A. 1. a. Description générale
 - A. 1. b. Paramètres de confinement
- A. 2. Caractérisation temporelle
 - A. 2. a. Description générale
 - A. 2. b. Fonction histogramme
- A. 3. Conclusion

B) Identification du type membranaire – Type de Gram

- B. 1. Description générale
- B. 2. Discrimination du type de Gram
- B. 3. Conclusion

C) Conclusion

L'étape d'identification est la première étape du diagnostic bactérien. En l'absence d'équipements de spectroscopie de masse elle est divisée en de nombreuses sous-étapes qui permettent l'identification progressive d'après des critères tels que la morphologie, le comportement (déplacement), la réaction enzymatique, le type membranaire et bien d'autres réponses à de multiples tests. Nous montrons dans ce chapitre comment le piégeage de bactéries sur cristaux photoniques 1D et 2D permet d'avoir accès à certaines de ces informations. Dans un premier temps nous présentons comment notre méthode de caractérisation spatiale apporte de l'information sur la morphologie et les déplacements bactériens. Nous utilisons également la caractérisation temporelle pour obtenir une véritable signature, propre à chaque bactérie. Dans un second temps nous adreßons la caractérisation du type membranaire des bactéries (type de Gram) par la méthode de caractérisation temporelle.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de deux publications :

- ✎ *Single-cell bacterium identification with a SOI optical microcavity.* M. Tardif, J.-B. Jager, P. R. Marcoux, K. Uchiyamada, E. Picard, E. Hadji & D. Peyrade, *Appl. Phys. Lett.* **109**, 133510 (2016).
- ✎ *Gram-type Differentiation of Bacteria with 2D Hollow Photonic Crystal Cavities.* R. Therisod, M. Tardif, P. R. Marcoux, E. Picard, J.-B. Jager, E. Hadji, D. Peyrade & R. Houdré, *Applied Physics Letters* **113**, 111101 (2018).

A) Étude comportementale et identification

Dans ce chapitre sera utilisée uniquement la première configuration du dispositif (un laser) présentée au **Chapitre II**. Dans un premier temps, nous présentons les résultats du piégeage de trois types de bactérie sur cristal photonique 1D (CMT5) : *S. epidermidis*, *E. coli* et *B. subtilis* (**Fig. V.1**). Les piégeages présentés dans cette première partie de chapitre ont tous été réalisés sur la même cavité, d'un facteur de qualité de 3000. Afin d'extraire de l'information de ces piégeages, deux méthodes de caractérisation ont été développées [ref 1].

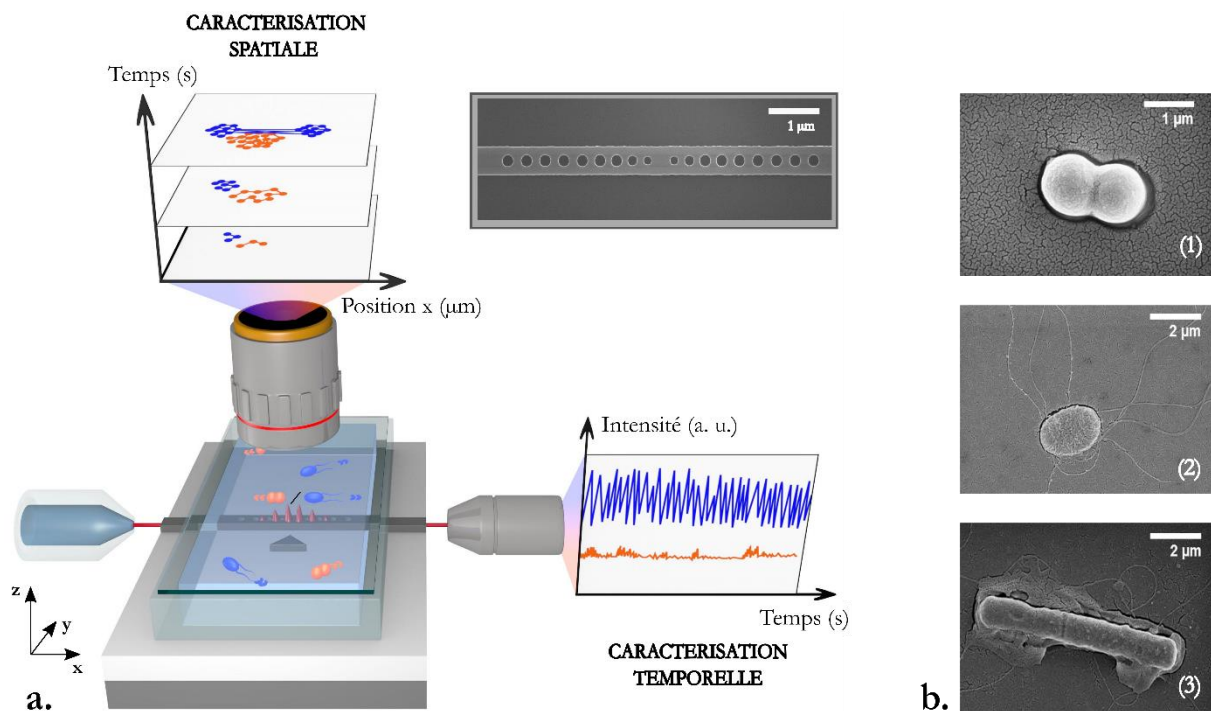


Fig. V.1 – a. Dispositif de piégeage et méthodes de caractérisation (spatiale & temporelle) développées pour identifier une bactérie piégée. Cette étude a été réalisée sur un unique cristal photonique 1D (CMT5, image MEB en encart). Les mesures relatives à *E. coli* apparaissent en bleu et celles relatives à *S. epidermidis* apparaissent en orange. **b.** Images MEB des trois bactéries étudiées : (1) *S. epidermidis*, (2) *E. coli* et (3) *B. subtilis*.

La première est la méthode de caractérisation spatiale qui repose sur l'analyse de la trajectoire des bactéries (piégées ou non), enregistrée à l'aide du système de visualisation situé au-dessus de l'échantillon. La seconde est la méthode de caractérisation temporelle qui repose sur l'analyse du signal optique transmis par la structure. Ces deux méthodes ont été introduites au **Chapitre III**.

A. 1. Caractérisation spatiale

A. 1. a. Description générale

La méthode de caractérisation spatiale repose donc sur l'analyse des trajectoires des bactéries piégées. Sur la **Fig. V.2a** sont représentés des exemples de trajectoires de bactéries non piégées pour les trois bactéries étudiées. Ces trajectoires correspondent au déplacement des bactéries dans le plan xy pendant 50 secondes.

Ces bactéries sont en suspension dans de l'eau déionisée et sont donc principalement animées par leur mouvement brownien (pas de mouvement erratique lié à l'utilisation du flagelle détecté). On observe bien le caractère aléatoire de ces trajectoires. On observe également que le déplacement est plus important chez les petites bactéries *E. coli* et *diplococcus* de *S. epidermidis* que chez *B. subtilis* qui est deux à trois fois plus longue. L'ensemble de ces observations confirme le caractère brownien de ces déplacements [ref 2].

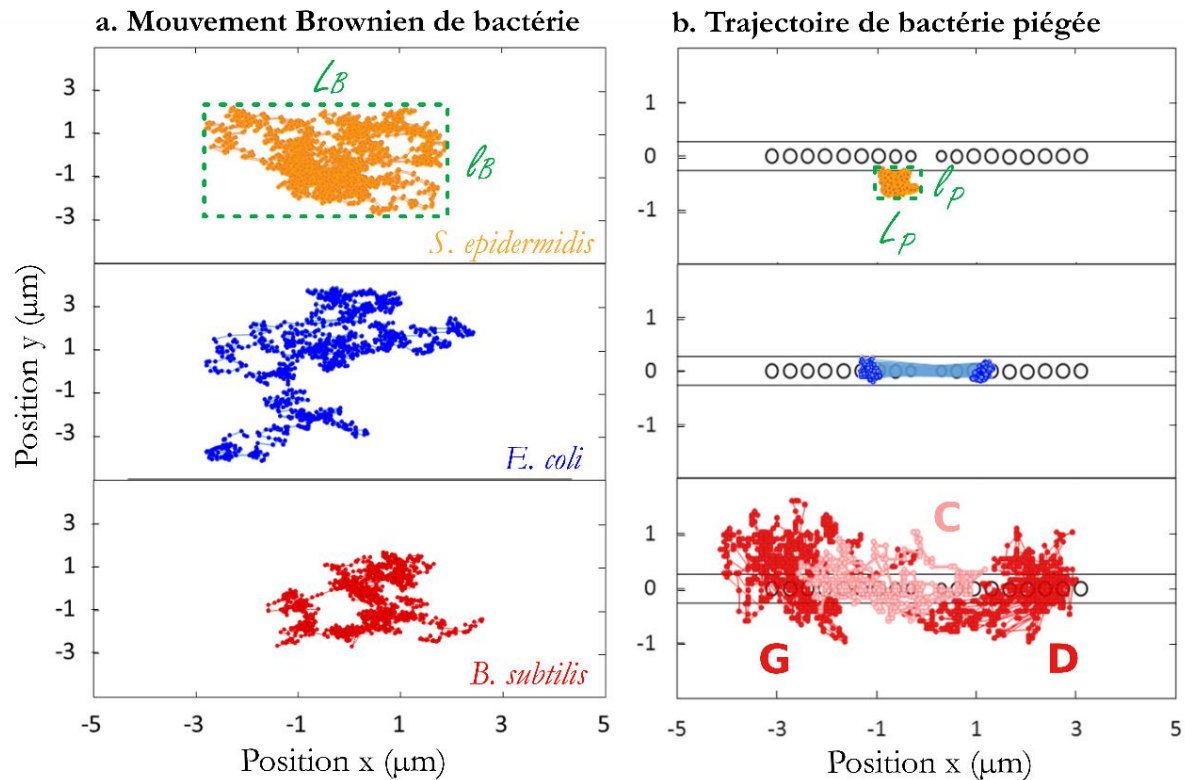


Fig. V.2 – **a.** Mouvement brownien d'un *diplococcus* de *S. epidermidis* (orange), d'une bactérie *E. coli* (bleu) et d'une bactérie *B. subtilis* (rouge). Les trajectoires ont été enregistrées sur 50 secondes et chaque point représente la position du centre de la bactérie étudiée aux différents temps de mesure. **b.** Trajectoire des trois bactéries piégées pendant 50 secondes : *S. epidermidis* (orange), *E. coli* (bleu) et *B. subtilis* (rouge). Suivi du centre du *diplococcus* de *S. epidermidis* et de la bactérie *E. coli*. Suivi des extrémités gauche (G) et droite (D) et du centre de la bactérie (C) pour *B. subtilis*.

Sur la **Fig. V.2b** sont représentés des exemples de trajectoires de bactéries piégées pour les trois bactéries étudiées. Ces trajectoires correspondent ici aussi à 50 secondes de déplacement des bactéries en interaction avec le piège.

Tout d'abord, on observe la contrainte exercée par le piège sur la trajectoire des bactéries (déplacement réduit comparé à celui d'une bactérie non-piégée). Comme évoqué dans les chapitres précédents les bactéries piégées continuent de se déplacer, mais leur interaction avec le piège limite ce déplacement.

On distingue trois comportements distincts dans le déplacement des trois bactéries piégées : le *diplococcus* de *S. epidermidis* se déplace peu, et reste autour d'une position d'équilibre, *E. coli* semble osciller entre deux positions d'équilibre tandis que *B. subtilis* a un déplacement bien plus important que ses consœurs. Les points d'équilibre observés chez *S. epidermidis* et *E. coli* correspondent aux maxima de champ de la microcavité (**Chapitre II**, [ref 3]). On observe également que *B. subtilis* a tendance à se déformer sur le piège : le déplacement de ses extrémités et de son centre (**Fig. V.2b**) ne sont pas équivalents.

A. 1. b. Paramètres de confinement

Les paramètres de confinement ont été présentés au **Chapitre III, partie A**. Les valeurs de ces différents paramètres pour la **Fig. V.2** sont répertoriées dans le tableau de la **Fig. V.3**.

Bactérie	Facteur de confinement $\ell_B \cdot \ell_B / \ell_P \cdot \ell_P$	Confinement transverse ℓ_B / ℓ_P	Confinement latéral ℓ_B / ℓ_P
<i>S. epidermidis</i>	57	9,5	6
<i>E. coli</i>	30,6	15,5	2
<i>B. subtilis</i>	3,2	2,8	1,1

Fig. V.3 – Analyse numérique du comportement spatial des bactéries *S. epidermidis*, *E. coli* et *B. subtilis* piégées et non-piégées. Le confinement transverse caractérise la direction y et le confinement latéral la direction x.

Ces valeurs numériques confirment les observations précédentes. Le déplacement du *diplococcus* de *S. epidermidis*, de la bactérie *E. coli* et de la bactérie *B. subtilis* sont respectivement réduits d'un facteur de 57 - 30,6 et 3,2 lorsque les bactéries sont piégées si on les compare à leurs homologues libres. En prenant toujours les bactéries dans cet ordre, le confinement est de moins en moins important. On peut également observer que le confinement est plus important dans la dimension transverse que dans la dimension latérale. Pour *S. epidermidis* les confinements transverse et latéral sont du même ordre de grandeur, ce qui peut être lié à sa forme sphérique. En effet, on observe sur les images de piégeage (**Fig. V.4**) que seule une des deux sphères du *diplococcus* est piégée et que celle qui lui est attachée se déplace.



Fig. V.4 – Exemple de trajectoires de *diplococcus* de *S. epidermidis* piégés (bleu) et libres (non-piégés, trajectoires orange et verte) sur 50 secondes. Les bactéries sont repérées par un cercle blanc.

Il semble que dans le piège un *diplococcus* se comporte donc comme un *coccus* (une seule sphère). C'est ce phénomène qui explique pourquoi la trajectoire de *S. epidermidis* est décalée de la cavité (axe y, **Fig. V.2b**). C'est le centre du *diplococcus* qui est détecté, la sphère piégée est bien centrée sur un maxima de champ. Pour *E. coli* et *B. subtilis* le confinement latéral prévaut plus largement. Cela est consistant avec le comportement de ces bactéries de forme allongée qui, lorsqu'elles sont piégées, s'alignent le long de la structure optique (leur plus longue dimension parallèle à la cavité). Nous pouvons en déduire que les contributions latérales et transverses apportent des informations sur la symétrie de la bactérie et nous permettent de distinguer les bactéries sphériques (*coccus*) de celles qui ont une forme de bâtonnet (bacilles).

La taille importante et la forme de *B. subtilis* impliquent un confinement uniquement transverse (confinement latéral de 1.1) et assez faible. Ces résultats sont en adéquation avec les temps de piégeage caractéristiques des bactéries : s'il est possible de piéger *S. epidermidis* et *E. coli* durant plusieurs heures, le piégeage de *B. subtilis* ne peut durer que quelques minutes. Au-delà d'une dizaine de minutes elle parvient en effet à se dépiéger toute seule. Si *S. epidermidis* a un déplacement très réduit autour d'un maximum de champ de la microcavité, les déplacements de *E. coli* et *B. subtilis* sont plus importants. Cela peut être également dû à leur flagelle qui augmente leur mobilité. Finalement, les trois bactéries étudiées présentent trois signatures spatiales distinctes, liées à leur taille, leur morphologie (forme) et à leur mobilité intrinsèque (flagelles).

A. 2. Caractérisation temporelle

A. 2. a. Description générale

La méthode de caractérisation temporelle repose sur l'analyse du signal optique transmis par la structure optique durant le piégeage de bactérie. De manière plus précise, elle consiste à extraire de l'information des variations d'intensité observées. Comme expliqué dans le **Chapitre III, Paragraphe B**, la longueur d'onde injectée dans la structure optique est toujours la même lorsque l'on souhaite piéger un objet en suspension dans l'eau. On injecte la longueur d'onde de résonance de la structure optique dans l'eau ($\lambda_{\text{rés,EDI}}$). L'intensité du signal enregistré en sortie est alors constante, à puissance injectée constante. On observe **Fig. V.5** les deux phénomènes caractéristiques du piégeage : la diminution brutale de l'intensité transmise (d'environ 20% ici) et les oscillations haute fréquence de l'intensité transmise sur l'exemple du piégeage d'une bactérie *E. coli* sur une cavité CMT5.

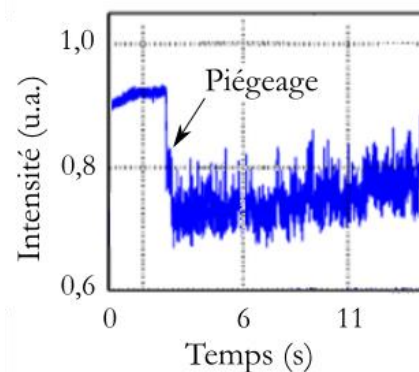


Fig. V.5 – Exemple de signal de piégeage pour la bactérie *E. coli*. Le piégeage est caractérisé par deux phénomènes : une diminution de l'intensité transmise par la structure optique d'environ 20% et de fortes oscillations.

Dans cette première partie de chapitre (A) nous analysons uniquement les informations que nous pouvons avoir dans les oscillations. Dans la seconde partie nous exploiterons à la fois la variation d'intensité au moment du piégeage et les oscillations dans l'intensité transmise enregistrées au cours du piégeage.

Les oscillations sont liées aux variations de recouvrement bactérie-champ lors du déplacement de la bactérie piégée. Cela induit un déplacement de la longueur d'onde de résonance de la microcavité, ce qui amène des fluctuations dans l'intensité transmise. **Fig. V.6** sont représentées les variations d'intensité enregistrées lors du piégeage des bactéries *S. epidermidis* (orange), *E. coli* (bleu) et *B. subtilis* (rouge) pendant 10 secondes. Le signal transmis par la cavité dans l'eau en absence de piégeage est également représenté (courbe noire).

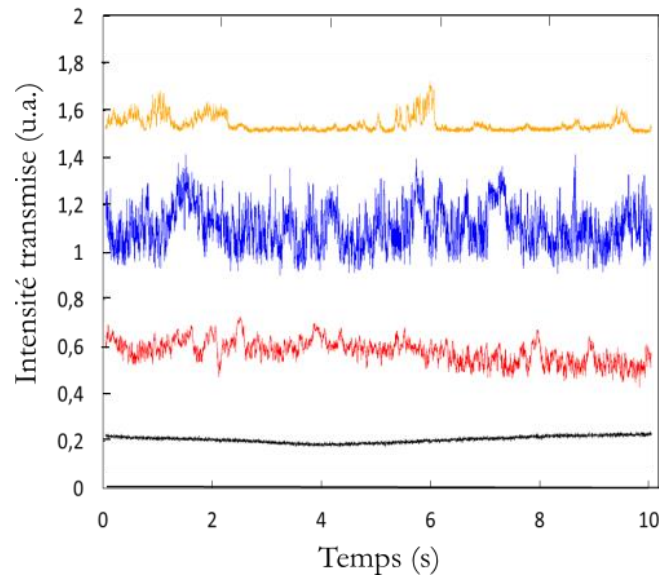


Fig. V.6 – Exemple d'intensités transmises par une structure optique CMT5 lors du piégeage d'un *diplococcus* de *S. epidermidis* (orange), d'une bactérie *E. coli* (bleu) et d'une bactérie *B. subtilis* (rouge) pendant 10 secondes. La courbe noire est un exemple d'intensité transmise par la structure optique en cas d'absence de bactérie dans le piège. Les courbes ont été décalées artificiellement (ordonnée) afin d'améliorer la lisibilité de la figure.

On observe trois signatures optiques très distinctes suivant le type de bactérie piégée. Afin d'extraire de l'information de ce piégeage nous calculons la fonction histogramme de ces signaux, selon la méthode présentée au **Chapitre III**.

A. 2. b. Fonction histogramme

La fonction histogramme est calculée avec la fonction *Hist* du logiciel Scilab® [ref 4]. Un exemple de code et de tracé de figure est disponible en **annexe 3**. Sur la **Fig. V.7** est représenté le résultat de ce code pour le calcul de la fonction histogramme du signal de piégeage de la bactérie *E. coli*, piégée pendant 50 secondes.

La forme de cette fonction histogramme, qui représente le nombre d'occurrences de chaque valeur d'intensité transmise par la structure, est très liée à l'amplitude des oscillations du signal de piégeage. On observe ici que la fonction histogramme est assez large : les différentes valeurs d'intensité transmises apparaissent avec une probabilité assez similaire. Elle n'est pas symétrique, ce qui traduit une position privilégiée de la bactérie dans le piège, qui correspond ici à une faible intensité transmise c'est-à-dire à un piégeage plutôt fort. La bactérie a donc tendance à être piégée dans les zones où le piégeage est optimisé c'est-à-dire que le recouvrement champ-bactérie est maximal.

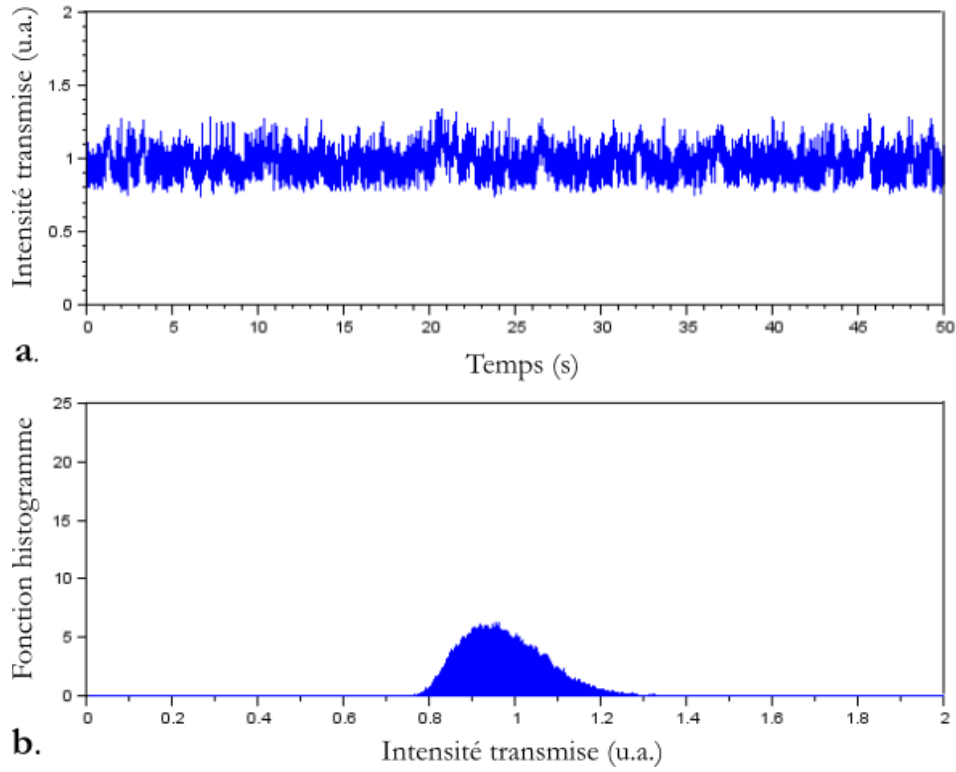


Fig. V.7 – a. Intensité transmise par une structure optique CMT5 lors du piégeage d'une bactérie *E. coli* pendant 50 secondes. b. Fonction histogramme correspondant au signal de la **Fig. V.7a**.

Sur la **Fig. V.8** sont représentées les fonctions histogramme correspondant aux signaux présentés **Fig. V.6**, calculées pour 10 secondes de piégeage. Les fonctions histogrammes ont été pivotées de 90° pour une meilleure compréhension de ce qu'elles représentent.

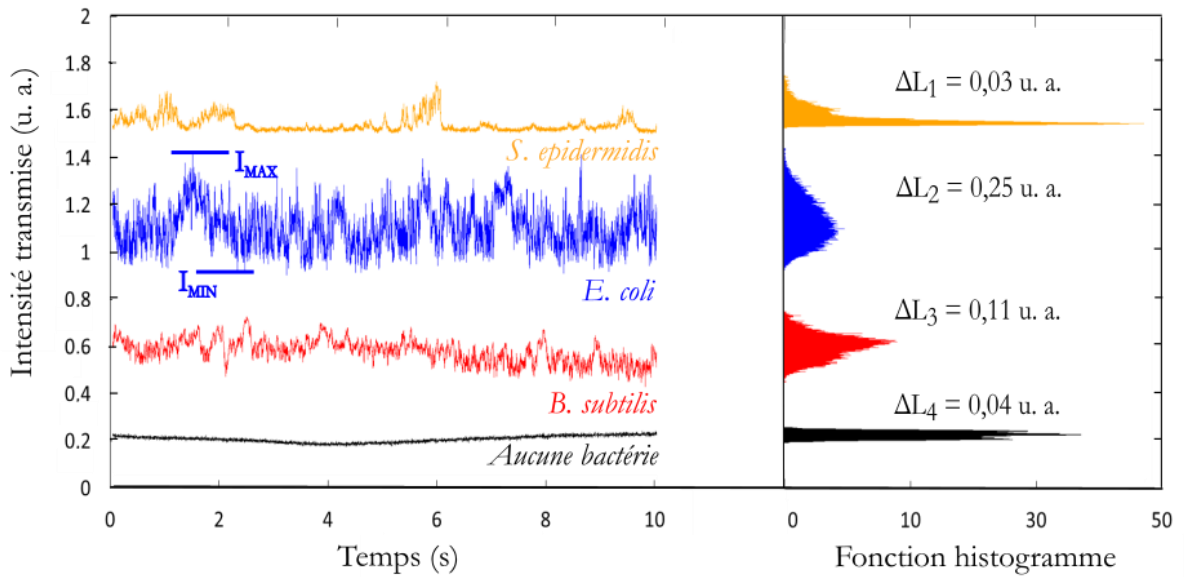


Fig. V.8 – Signaux de piégeage des bactéries *S. epidermidis*, *E. coli* et *B. subtilis* déjà présentés **Fig. V.6**. Les fonctions histogrammes de ces signaux sont représentées sur la partie droite de la figure. La largeur à mi-hauteur (ΔL) de ces histogrammes est également représentée.

1. Différentiation bactérienne

La fonction histogramme traduit le comportement des bactéries dans le piège. Par exemple *S. epidermidis* dont le déplacement reste centré autour d'une unique position d'équilibre a donc une valeur d'intensité transmise privilégiée, correspondant à cette position d'équilibre. Sa fonction histogramme est donc plus haute que pour les deux autres bactéries qui ne possèdent pas cette unique position d'équilibre. Les larges oscillations d'amplitude quasi-constantes traduisent également le déplacement de la bactérie *E. Coli* sur le piège. Son trajet entre les deux maxima de champ de la cavité la fait alterner entre un recouvrement maximal champ-bactérie (I_{MIN} , maximum de champ) et un recouvrement minimal (I_{MAX} , centre de la cavité). La lecture du signal de *B. subtilis* est plus complexe à lire car une unique bactérie va interagir avec plusieurs maxima de champ de la cavité. La faible amplitude de son signal de piégeage peut cependant être liée à sa déformation et à sa mobilité plus lente que les deux autres bactéries.

Les trois signatures optiques sont donc également visibles dans les trois fonctions histogrammes. Afin de les distinguer par un paramètre numérique, on calcule leur largeur à mi-hauteur ΔL . Ces largeurs à mi-hauteur sont également représentées sur la **Fig. V.8**.

On observe que les fonctions histogrammes correspondant aux signaux de piégeage de la bactérie *E. coli* sur 50 secondes (**Fig. V.7**) ou 10 secondes (**Fig. V.8**) sont très similaires. Un piégeage court est donc suffisant pour extraire l'essentiel des informations apportées par le piégeage. A partir de cette observation, il est intéressant d'étudier la pertinence du calcul de la fonction histogramme pour l'analyse des signaux de piégeage en fonction du temps de piégeage. La pertinence de l'utilisation de la fonction histogramme peut être évaluée grâce au paramètre de largeur à mi-hauteur de cette fonction. Nous avons donc calculé la largeur à mi-hauteur ΔL de la fonction histogramme des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* pour des temps de piégeage allant de 1 à 50 secondes. Ces résultats sont représentés **Fig. V.9**.

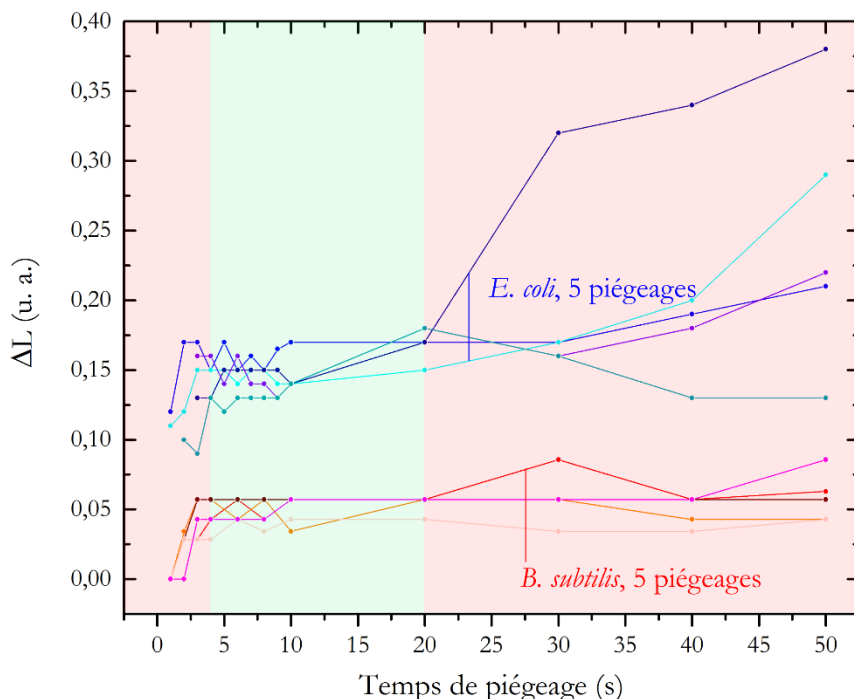


Fig. V.9 – Largeur à mi-hauteur ΔL de la fonction histogramme des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* en fonction du temps de piégeage analysé. Le créneau pendant lequel la valeur de ΔL est pertinente est représenté en vert.

Ces mesures ayant été réalisées après les piégeages présentés dans cette partie, ils n'ont pas pu être effectués sur la même structure optique mais sur une autre structure CMT5. Les valeurs de ΔL étant structure-dépendantes, les valeurs numériques sont différentes de celles observées **Fig. V.8**. Cependant les tendances sont les mêmes, avec des valeurs de ΔL globalement réduites comparées aux précédentes.

On observe que lorsque le temps de piégeage analysé est insuffisant ou trop important les valeurs de largeur à mi-hauteur ΔL ne sont pas pertinentes. Cela peut s'expliquer par un manque d'information sur le comportement (et donc le déplacement) de la bactérie piégée pour des temps de piégeage inférieurs à 4 secondes. Pour des temps de piégeage supérieurs à 20 secondes cela peut être dû aux variations de couplage de la lumière dans la structure. En effet on observe que sur les signaux transmis par la cavité en absence de bactérie piégée (courbe noire **Fig. V.6**), l'intensité n'est pas constante sur 10 secondes, elle l'est encore moins sur 50 secondes. De légères variations d'intensité peuvent donc se produire ponctuellement. Plus le temps de piégeage est long, plus la probabilité de biaiser le signal de piégeage augmente. Ce phénomène est important lors du piégeage de *E. coli*, on le retrouve moins lors du piégeage de *B. subtilis* sur la **Fig. V.9**. Il convient donc de choisir un temps de piégeage compris entre 4 et 20 secondes afin de calculer une fonction histogramme pertinente pour l'identification bactérienne.

2. Etude statistique

La largeur à mi-hauteur de la fonction histogramme des signaux de piégeage est un paramètre reproductible. Sur la **Fig. V.10** sont représentés la valeur moyenne et l'écart type de la largeur à mi-hauteur ΔL de la fonction histogramme de quatre piégeages distincts pour chaque type de bactérie. On observe bien trois signatures distinctes, sans recouvrement entre les valeurs.

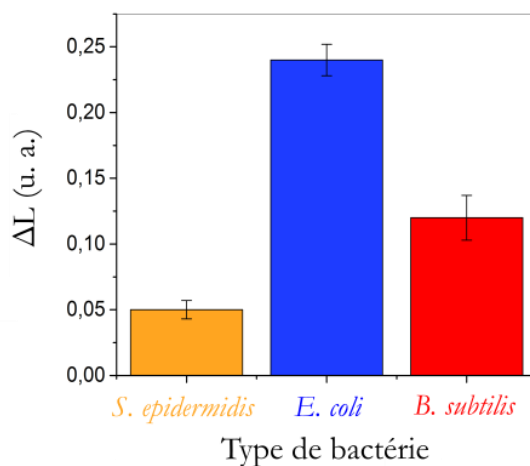


Fig. V.10 – Valeur moyenne et écart type de la mesure de la largeur à mi-hauteur (ΔL) des fonctions histogrammes des bactéries *S. epidermidis*, *E. coli* et *B. subtilis*. Quatre mesures ont été effectuées lors de quatre piégeages distincts par type de bactérie.

La largeur à mi-hauteur des fonctions histogrammes des signaux de piégeage est donc un critère pertinent pour différencier le type de bactérie piégée sur cet exemple. Nous montrons donc ici que l'analyse du signal de piégeage pendant quelques secondes est suffisante dans ce cas précis pour identifier le type de bactérie piégée. Les fortes différences de morphologie et de mobilité de ces bactéries permettent d'obtenir des signatures optiques très distinctes. Nous verrons en seconde partie de ce chapitre que lorsque les bactéries sont très similaires en matière de forme, de taille et de mobilité il est plus difficile de les distinguer.

A. 3. Conclusion

Nous avons développé deux méthodes de caractérisation permettant d'extraire de l'information du piégeage d'une bactérie unique par un piège de type cristal photonique 1D à cavité CMT5. La première permet de caractériser le comportement de la bactérie piégée à partir de ses déplacements. La seconde donne une information sur son comportement dans le temps. Un des avantages de ces méthodes est qu'elles peuvent être effectuées simultanément (en parallèle). Cela permet de relier les informations apportées par les deux méthodes pour une meilleure compréhension des phénomènes. Dans l'exemple décrit dans cette partie, uniquement trois bactéries ont été étudiées : *S. epidermidis*, *E. coli* et *B. subtilis*. Sur cet exemple nous avons montré que ces trois types de bactéries présentaient des signatures spatiales et optiques très distinctes. L'analyse réalisée a permis d'extraire des informations sur leur taille, leur morphologie et leur mobilité mais également de les identifier. Leur comportement lorsqu'elles sont piégées est en effet suffisamment distinct pour déterminer à l'aveugle le type de bactérie piégée.

Le fait de pouvoir utiliser simultanément les méthodes d'analyses spatiales et temporelles a permis de comprendre l'ensemble des phénomènes influant sur le signal optique transmis par la structure. Les informations apportées par la méthode temporelle sont extrêmement complètes, et cette méthode peut être utilisée dans un système intégré. J'ai donc choisi de développer cette méthode par la suite.

B) Identification du type membranaire – Type de Gram

B. 1. Description générale

Dans cette partie nous présentons le piégeage de sept types de bactéries sur un cristal photonique 2D à cavité creuse : *P. putida*, *N. sicca*, *E. coli*, *B. subtilis*, *L. innocua*, *S. epidermidis* et *Y. ruckeri* (**Fig. V.11**).

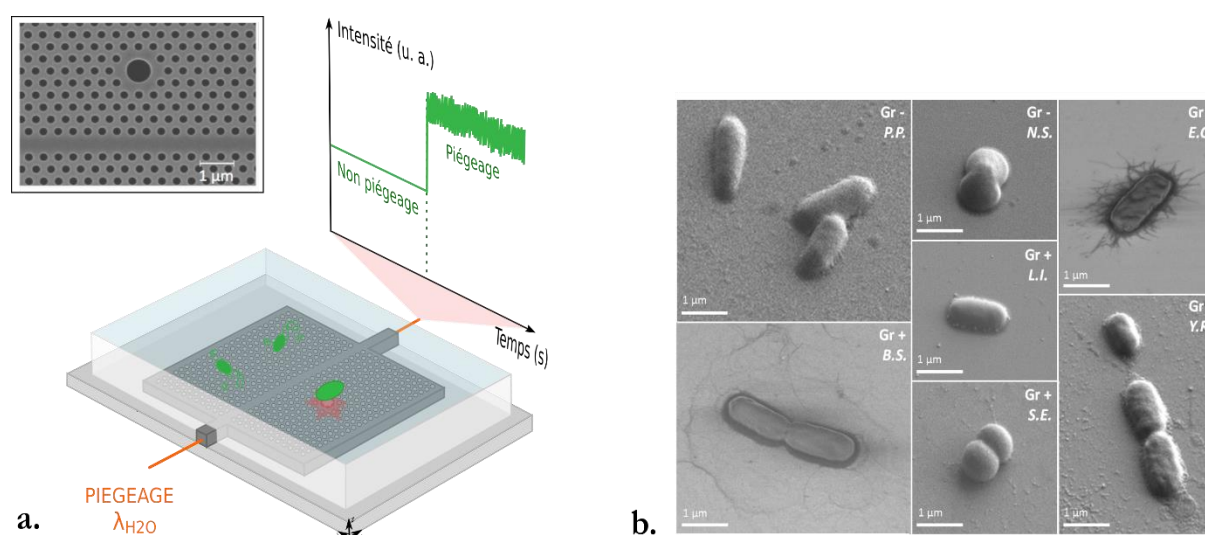


Fig. V.11 – **a.** Dispositif de piégeage, cette étude a été réalisée sur un unique cristal photonique 2D (cavité creuse, image MEB en encart). **b.** Images MEB des sept bactéries étudiées et informations sur leur type de Gram : *P. putida* (P.P.), *N. sicca* (N.S.), *E. coli* (E.C.), *Y. Ruckeri* (Y.R.), *B. subtilis* (B.S.), *S. epidermidis* (S.E.) et *L. innocua* (L.I.). **Gr -** pour les bactéries Gram-négatives et **Gr +** pour les bactéries Gram-positives.

Les piégeages présentés dans cette seconde partie de chapitre ont tous été réalisés sur la même cavité, d'un facteur de qualité de 4500. Forts des résultats de la première partie de ce chapitre, nous avons développé la méthode de caractérisation temporelle du piégeage des bactéries. Nous avons précédemment concentré notre attention sur les oscillations de l'intensité transmise par la structure optique de piégeage. Nous nous intéresserons ici également à la variation brutale d'intensité transmise au moment du piégeage [ref 5].

Comme expliqué **Chapitre III** le piégeage d'une bactérie dans une cavité creuse se traduit par une brusque augmentation de l'intensité transmise par la structure puis par des oscillations haute fréquence. Ce phénomène est représenté également **Fig. V.12**.

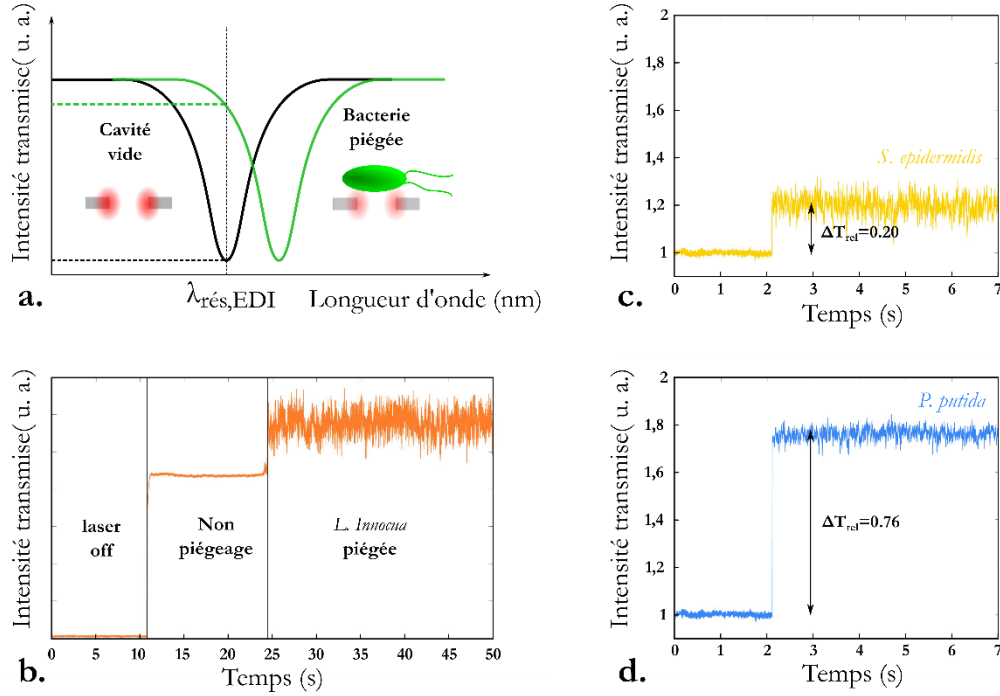


Fig. V.12 – a. Décalage de la longueur d'onde de résonance d'une cavité creuse (cristal photonique 2D) en présence d'une bactérie piégée. b. Intensité transmise par une cavité creuse lors du piégeage de la bactérie *L. innocua*. Lorsque le Laser est éteint (off), la lumière n'est pas injectée dans la structure optique. Puis on injecte la longueur d'onde de résonance de la structure dans l'eau (non-piégeage) et on attend qu'une bactérie s'approche du piège. c. Intensité transmise par la cavité creuse lors du piégeage de *S. epidermidis*, le décalage enregistré ΔT_{rel} (décalage en transmission relatif) vaut 0,20. d. Intensité transmise par la cavité creuse lors du piégeage de *P. putida*, le décalage vaut $\Delta T_{rel} = 0,76$. Tous les piégeages ont été réalisés sur la même cavité creuse.

On observe sur cette même figure que suivant le type de bactérie piégée le saut enregistré dans l'intensité transmise varie. Nous caractérisons cette brusque variation d'intensité transmise par le paramètre ΔT_{rel} . Ce paramètre est par exemple près de quatre fois plus important lors du piégeage de *P. putida* que lors de celui de *S. epidermidis* (**Fig. V.12c-d**).

B. 2. Discrimination du type de Gram

Nous avons évalué le paramètre ΔT_{rel} pour les sept types de bactérie étudiées. Chaque signal a été translaté pour que l'intensité transmise par la cavité vide soit d'une valeur de 1 (unité arbitraire). Pour plus de précision et pour outrepasser la variabilité intrinsèque de la réponse des bactéries nous avons réalisé au minimum dix

piégeages de chaque type de bactérie. Nous avons réalisé ces mesures sur trois jours différents sur une période de 5 mois. Chaque type de bactérie est piégé pendant 5 secondes, puis dépiégé (laser éteint pendant 30 secondes à 2 minutes) afin d'en piéger d'autres. Il convient d'attendre suffisamment longtemps lorsque le laser est éteint afin que les bactéries piégées s'éloignent et que d'autres s'approchent grâce à leur mouvement brownien. Nous pouvons nous aider de la colonne de visualisation pour ajuster le temps d'attente et vérifier le déplacement des bactéries. Chaque piégeage dure 5 secondes afin de satisfaire aux conditions évoquées au paragraphe précédent pour le calcul de la fonction histogramme. Sur la **Fig. V.13** est représenté le décalage en transmission relatif ΔT_{rel} pour chaque type de bactérie.

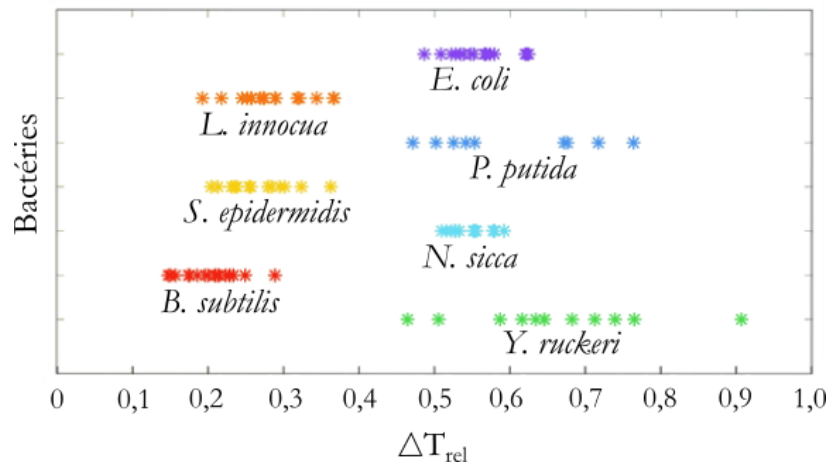


Fig. V.13 – Transmission relative ΔT_{rel} de dix signaux de piégeage par type de bactérie parmi *P. putida*, *N. sicca*, *E. coli*, *Y. Ruckeri*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* et *L. innocua*.

Nous avons fait le choix ici de travailler à haute concentration de bactéries (3McF) et en piégeons donc plusieurs à chaque piégeage. Le but de ce protocole expérimental est de maximiser le volume d'interaction champ-bactéries afin de limiter l'influence des paramètres morphologiques des bactéries.

On observe que pour chaque type de bactérie les valeurs de décalage en transmission relatif ΔT_{rel} des dix piégeages sont localisées autour d'une valeur, avec une dispersion plus ou moins importante. Cette dispersion est particulièrement importante pour les bactéries *P. putida* et *Y. ruckeri*. Cette variabilité est inhérente aux bactéries et peut être amplifiée par notre système de piégeage (variabilité du recouvrement champ-bactérie lors du piégeage). Malgré cette dispersion on observe que deux groupes se forment : *L. innocua*, *S. epidermidis* et *B. subtilis* présentent un décalage en transmission relatif inférieur à celui des bactéries *E. coli*, *P. putida*, *N. sicca* et *Y. ruckeri*. On observe donc une différence sur le paramètre ΔT_{rel} suivant le type de Gram des bactéries. De manière générale, les bactéries à Gram-positif présentent un décalage compris entre 0,15 et 0,37 tandis que les bactéries à Gram-négatif présentent un décalage compris entre 0,47 et 0,91. Une démarcation apparaît autour de la valeur de décalage de 0,40. Les signaux de piégeage nous permettent donc de déterminer le type de Gram des bactéries sur cet exemple à sept bactéries.

Nous avons choisi de travailler avec ces sept espèces car elles présentent des propriétés de taille, de forme et de mobilité différentes. Nous montrons ici que malgré cette hétérogénéité, le dispositif permet de discriminer le type de Gram dans 100% des cas (sur cet exemple). Comme présenté dans le **Chapitre IV**, la différence de type de Gram est en fait une différence de structure membranaire. Cette différence de structure (épaisseur et composition) entraîne à la fois des différences de propriétés de déformation et de propriétés optiques (indice). Les membranes des bactéries à Gram-négatif présentent une plus grande capacité de déformation [ref 6] ce qui pourrait augmenter le recouvrement champ-bactérie. La différence de structure

entraîne également une différence d'indice optique [ref 5,7]. La réponse de la structure optique étant dépendante de ces deux paramètres (recouvrement champ-bactérie et indice optique), il est donc cohérent qu'elle soit sensible au type de Gram des bactéries.

Pendant les piégeages de bactéries nous avons mesuré le décalage en longueur d'onde de résonance de la cavité optique au moyen du dispositif à deux lasers. Un exemple de ce décalage est montré Fig. V.14 pour une bactérie de type Gram positif (*S. epidermidis*) et Gram négatif (*P. putida*).

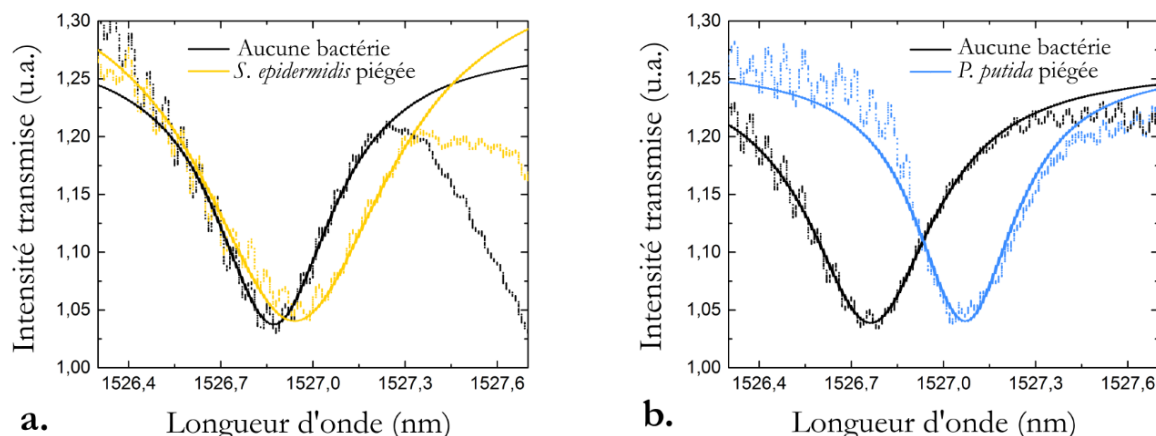


Fig. V.14 – Décalage en longueur d'onde de résonance de la cavité creuse lors du piégeage d'une bactérie à Gram positif *S. epidermidis* (a) et d'une bactérie à Gram négatif *P. putida* (b).

On observe bien la même tendance pour le décalage en longueur d'onde de résonance de la cavité que pour le décalage en transmission relatif ΔT_{rel} . Le décalage en longueur d'onde de résonance est plus important lors du piégeage des bactéries à Gram négatif. Nous avons vu lors de la caractérisation des cristaux photoniques et nous verrons également au chapitre suivant que cela peut être dû à un indice optique plus important de l'objet piégé. Il est donc fortement probable que les bactéries à Gram négatif aient un indice optique membranaire plus important que les bactéries à Gram positif.

Sur la Fig. V.15 les résultats sur l'identification du type de Gram des bactéries piégées sont mis en lumière, ainsi que la dispersion des données sur les dix piégeages.

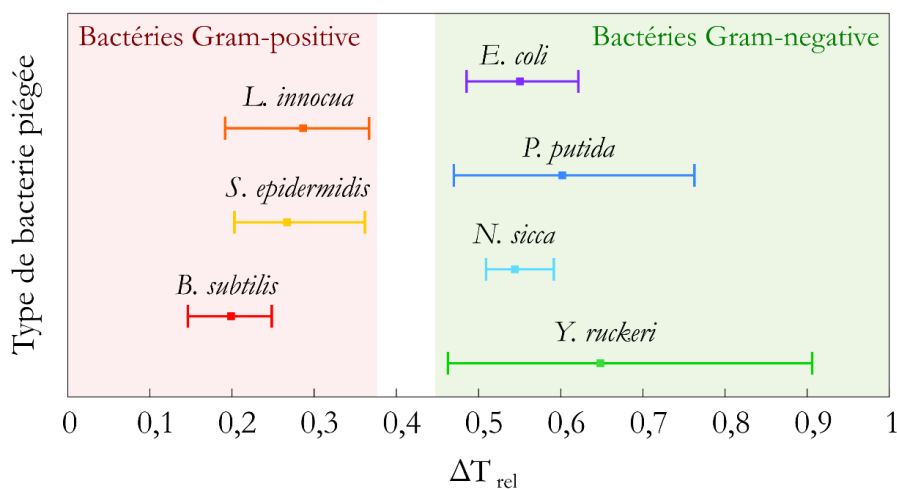


Fig. V.15 – Dispersion de la transmission relative ΔT_{rel} de dix signaux de piégeage par type de bactérie parmi *P. putida*, *N. sicca*, *E. coli*, *Y. Ruckeri*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* et *L. innocua*. Cette méthode permet d'identifier le type de Gram des bactéries piégées.

Si on trace la fonction histogramme moyenne des dix signaux de piégeage pour chaque type de bactérie, en prenant pour abscisse le décalage en transmission relatif ΔT_{rel} , on obtient la **Fig. V.16**.

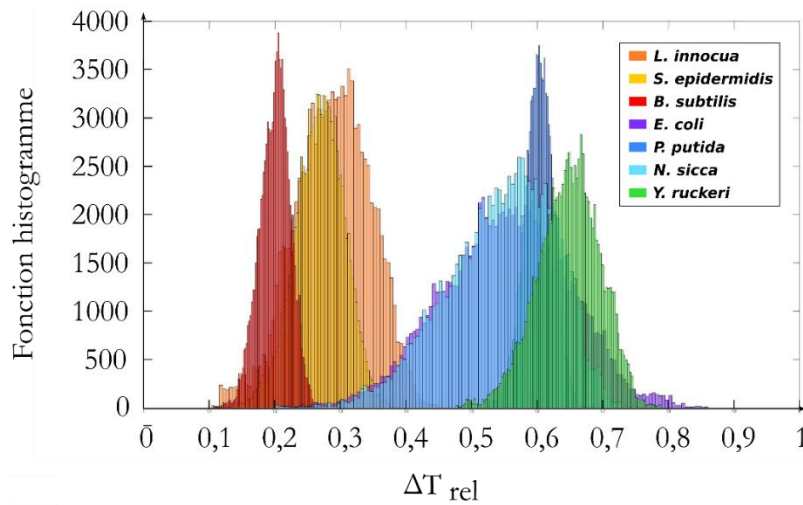


Fig. V.16 – Fonction histogramme moyenne des signaux de piégeage des bactéries *P. putida*, *N. sicca*, *E. coli*, *Y. Ruckeri*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* et *L. innocua*. La moyenne est effectuée sur dix piégeages indépendants par type de bactérie.

On observe sur les histogrammes de la **Fig. V.15** la même tendance que précédemment sur le décalage en transmission relatif ΔT_{rel} entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Sur les fonctions histogrammes il est cependant difficile de tirer une conclusion. Il est possible d'identifier certaines bactéries en combinant la largeur à mi-hauteur de leur fonction histogramme et le décalage en transmission relatif. Par exemple nous pouvons identifier la bactérie *B. subtilis* dans le groupement Gram-positif et la bactérie *P. putida* dans le groupement Gram-négatif. En effet la largeur à mi-hauteur de leur fonction histogramme est plus faible que leurs homologues de type de Gram. Certaines bactéries comme *E. coli*, *P. putida* et *N. sicca* présentent une fonction histogramme assez large, témoin d'une mobilité plus importante dans le piège. Cependant nous ne pouvons pas corrélérer cela avec leur taille ou leur flagellation.

Il est donc impossible d'identifier tout type de bactérie piégée avec cette méthode et il sera nécessaire d'extraire plus d'information de ces signaux de piégeage pour faire de notre dispositif un outil d'identification complet. Il faudra également par la suite déterminer l'influence du piégeage d'une bactérie ou de quelques bactéries (<10) dans les informations extraites par l'analyse du piégeage.

B. 3. Conclusion

Nous avons ici démontré le piégeage et l'identification du type membranaire (type de Gram) de sept bactéries. Cette étude repose sur l'utilisation d'une cavité creuse (cristal photonique 2D) dans une configuration à un laser permettant à la fois de piéger et d'extraire de l'information de ce piégeage. Nous avons ici développé la méthode de caractérisation temporelle présentée au paragraphe précédent. L'analyse porte à la fois sur l'amplitude des oscillations de l'intensité transmise par la structure (fonction histogramme) et la variation d'intensité brutale enregistrée au moment du piégeage.

C) Conclusion

Ce chapitre porte sur l'identification de bactéries piégées par des structures optiques à cristaux photoniques. Deux méthodes ont été développées afin d'extraire de l'information lors du piégeage : une méthode de caractérisation spatiale et une méthode de caractérisation temporelle. La première permet d'extraire de l'information de la trajectoire de la bactérie, la seconde du signal optique transmis par la structure optique. Ces deux méthodes permettent d'identifier des propriétés de forme, de taille, et de mobilité des bactéries. Elles permettent également de distinguer les propriétés membranaires (structure et composition) des bactéries. Dans le cas d'un nombre restreint de bactéries nous avons montré qu'il était possible de les identifier. Ce n'est cependant pas le cas lorsque le nombre de bactéries étudiées augmente. Nous avons développé plus spécifiquement la méthode de caractérisation temporelle qui présente l'avantage de pouvoir être utilisée dans un dispositif intégré. Il est certain que la quantité d'information que renferme le signal optique de piégeage offre d'autres possibilités qui pourront être développées par la suite afin d'obtenir une méthode d'identification plus complète.

Néanmoins ces travaux montrent que le piégeage de bactéries sur cristaux photoniques permet d'extraire de nombreuses informations traditionnellement requises pour l'identification bactérienne : morphologie, mobilité, structure membranaire. Toutes ces informations sont extraites en moins d'une minute de piégeage, sans ajout d'agent chimique, à faible concentration de bactéries. Les méthodes que nous proposons sont donc avantageuses par rapport aux méthodes classiques de diagnostic bactérien. Il est très probable que nous n'ayons pas extrait l'ensemble des informations auxquelles ces méthodes de caractérisation donnent accès et de nouveaux travaux permettront certainement d'améliorer la caractérisation des bactéries afin de permettre un jour leur identification complète par piégeage optique.

Le chapitre suivant concerne la seconde partie du diagnostic bactérien, à savoir la susceptibilité des bactéries à des agents antibactériens.

Références :

- [1] *Single-cell bacterium identification with a SOI optical microcavity*. M. Tardif, J.-B. Jager, P. R. Marcoux, K. Uchiyamada, E. Picard, E. Hadji & D. Peyrade, *Appl. Phys. Lett.* **109**, 133510 (2016).
- [2] *Étude expérimentale du mouvement brownien d'une particule colloïdale*. P. Maurer, J. Ferrand, M. Leocmach, T. Gibaud (2014).
- [3] *Optofluidic near-field optical microscopy: near-field mapping of a silicon nanocavity using trapped microbeads*. C. Pin, B. Cluzel, C. Renaut, E. Picard, D. Peyrade, E. Hadji & F. De Fornel, *ACS Photonics* **2**, 1410 (2015).
- [4] *Scilab*, logiciel open source gratuit diffusé sous licence CeCILL (compatible GPL), développé par Scilab Enterprises. Disponible sur <http://www.scilab.org>.
- [5] *Gram-type Differentiation of Bacteria with 2D Hollow Photonic Crystal Cavities*. R. Therisod, M. Tardif, P. R. Marcoux, E. Picard, J.-B. Jager, E. Hadji, D. Peyrade & R. Houdré, *Applied Physics Letters* **113**, 111101 (2018).
- [6] *In Situ Characterization of Differences in the Viscoelastic Response of Individual Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cells*. V. Vadillo-Rodriguez, S.R. Schooling & J.R. Dutcher, *J. Bacteriol.* **191**, 5518 (2009).
- [7] *Immersion Refractometry of Isolated Bacterial Cell Walls*. R. E. Marquis, *J. Bacteriol.* **116**, 1273-1279 (1973).

VI. Sensibilité des bactéries à un agent antibactérien et intégration du dispositif


A) Influence de la température

- A. 1. Généralités
- A. 2. Méthode d'analyse de microbiologie
- A. 3. Méthode d'analyse optique
- A. 4. Conclusion

B) Conclusion

*La seconde partie du diagnostic bactérien concerne la susceptibilité des bactéries aux agents antibactériens. Comme présenté au **Chapitre IV**, ces agents sont nombreux parmi lesquels la température, les antibiotiques, les agents oxydants de type javel... Nous proposons ici l'utilisation du piégeage de bactéries sur cristaux photoniques 1D pour déterminer l'influence d'agents antibactériens sur l'état des bactéries en temps réel et à faible concentration. L'objectif de ce chapitre est de déterminer si notre dispositif peut être sensible à des variations d'état de bactéries soumises à un stress thermique.*

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication :

 *Monitoring bacterial response to heat stress with on-chip optical micro-resonator.* M. Tardif, E. Picard, P. R. Marcoux, V. Gaude, J-B Jager E. Hadji & D. Peyrade, *en cours de publication* (2019).

A) Influence de la température

A. 1. Généralités

La température est un paramètre clé du développement bactérien. Chaque type de bactérie possède une température optimale de croissance T_c . Pour *E. coli*, adaptée à vivre dans le système intestinal humain, cette température T_c est de 37°C [ref 1]. Elles résistent à des températures extrêmes dans les basses températures et sont d'ailleurs conservées en souchier à -20°C ou entre -70° et -80°C sans altérer leurs fonctions vitales [ref 2]. C'est dans les températures supérieures à leur température optimale de croissance que les bactéries sont les plus vulnérables. Dans le cas de *E. coli*, une température supérieure à 42°C-45°C stoppe sa croissance [ref 1,3,4]. Cette sensibilité est exploitée dans les procédés de pasteurisation (~70°C) et de stérilisation (~140°C).

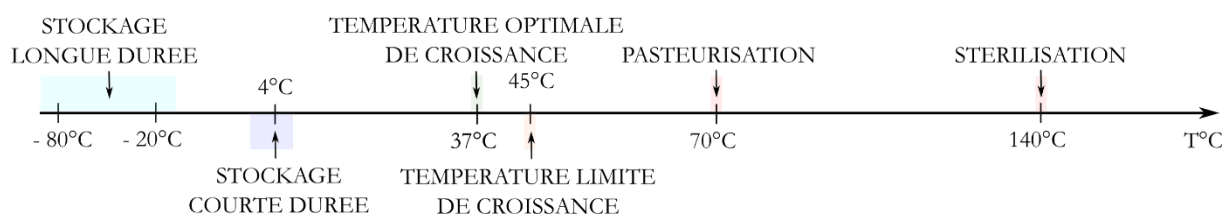


Fig. VI.1 – Températures clés pour la bactérie *E. coli* pour le stockage, la croissance la pasteurisation et la stérilisation.

A. 2. Méthode d'analyse de microbiologie

En microbiologie, l'influence de la température sur les bactéries est évaluée par leur **cultivabilité**, c'est à dire leur capacité à se diviser en conditions favorables (milieu nutritif, pH, température). Nous avons réalisé une première étude visant à évaluer l'influence de la température sur *E. coli* (souche ATCC 11775) selon le protocole de l'ouvrage *Encyclopedia of Food Microbiology* [ref 5]. Ce protocole consiste à soumettre des cultures bactériennes en milieu liquide à différentes températures pour différentes durées. La cultivabilité de ces échantillons est ensuite testée en les remplaçant pendant 24h en conditions optimales de croissance (milieu nutritif en boîte de Pétri, température de 37°C). Cette méthode permet d'évaluer la proportion de bactéries qui est restée cultivable dans l'échantillon après avoir été exposée au stress thermique.

Nous avons choisi d'étudier l'influence de quatre températures sur la bactérie *E. coli* : 37°C (température optimale de croissance), 45°C (température limite de croissance), 51°C et 70°C (pasteurisation) [ref 1,3,4]. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec cette méthode avec ceux présentés dans le **Paragraphe A. 3.** nous avons choisi d'étudier l'influence de la température sur une solution de bactéries en suspension dans de l'eau déionisée filtrée à 0,2 µm. Le protocole que nous avons utilisé est détaillé ci-dessous.

Protocole

Un volume de 5 mL de solution bactérienne à 0,5 McF est dilué dans un volume de 45 mL (EDI stérile) puis divisé en 10 tubes de 5 mL. Le liquide de dilution ainsi que les tubes utilisés ont préalablement été conservés à la température d'intérêt pendant plusieurs heures. L'ensemble des tubes est ensuite placé à la température d'intérêt dans une étuve. Toutes les 15 minutes un tube est prélevé et 100 µL de la solution qu'il contient sont étalés au râteau sur une boîte de pétri de type TSA. Il est

parfois nécessaire de réaliser des dilutions de cette solution pour favoriser l'étape suivante de comptage. Afin de pallier à d'éventuelles erreurs de manipulation ce protocole d'étalement sur boîte est répété sur trois boîtes différentes. L'ensemble de ces boîtes de Pétri est ensuite incubé à 37°C pendant 24h. Le nombre de bactéries cultivables (qui ont donc poussé sous forme de colonies à la surface de la boîte de Pétri) dans les 100 μ L prélevés est évalué manuellement à la suite de l'incubation. Seules les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 sont exploitables, d'où la nécessité des dilutions avant étalement. La proportion de bactéries cultivables dans l'échantillon de départ est ensuite calculée en prenant en compte les différents volumes prélevés et dilutions effectuées. Ce protocole est illustré **Fig. VI.2**, la méthode de comptage est détaillée au **Chapitre IV, Paragraphe B**.

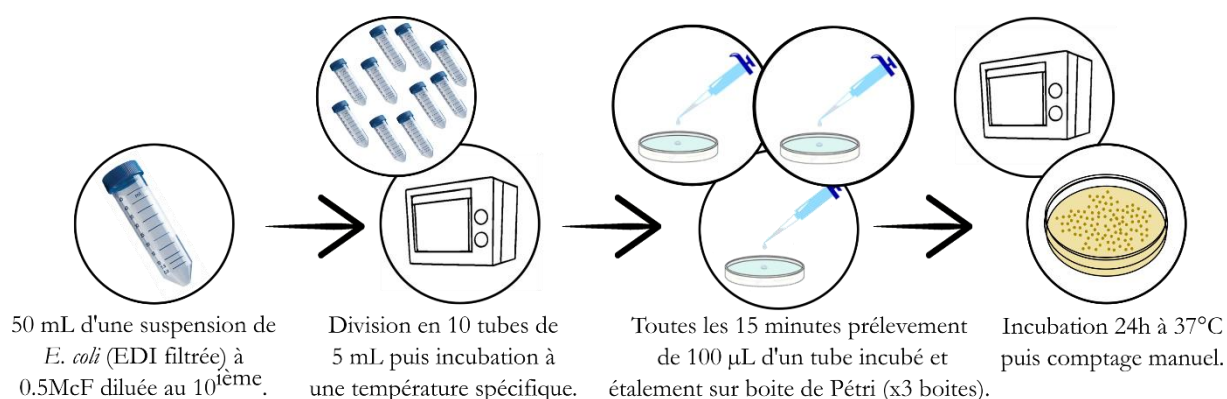


Fig. VI.2 – Protocole expérimental permettant de déterminer l'influence de la température sur la cultivabilité des bactéries. Cette méthode est traditionnellement utilisée en microbiologie [ref 5].

A partir de ces manipulations expérimentales, nous calculons le nombre de bactéries cultivables initialement présentes dans l'échantillon. Cela nous permet ensuite de calculer la proportion de bactéries cultivables dans l'échantillon en considérant qu'au temps zéro (au moment où l'on commence à soumettre les bactéries à un stress thermique) 100% des bactéries de l'échantillon sont cultivables. La **Fig. VI.3** résume ces données pour la température de 51°C.

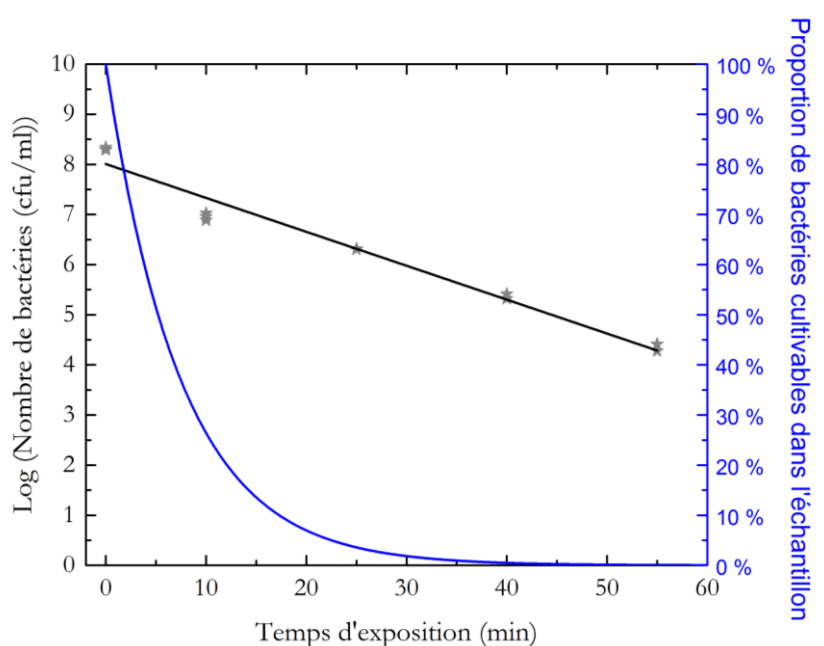


Fig. VI.3 – Calcul de la proportion de bactéries cultivables dans l'échantillon à partir du nombre de bactéries dans l'échantillon à 51°C. Les étoiles modélisent les valeurs expérimentales et la courbe bleue est calculée à partir de la courbe noire.

Sur la **Fig. VI.4** la proportion de bactéries cultivable dans les échantillons chauffés à 45°C, 51°C et 70°C est représentée, fonction du temps d'exposition à ces températures. La courbe à 37°C a été calculée à partir des trois premières grâce aux paramètres que nous décrirons par la suite : le temps de réduction décimal D_x et le paramètre z .

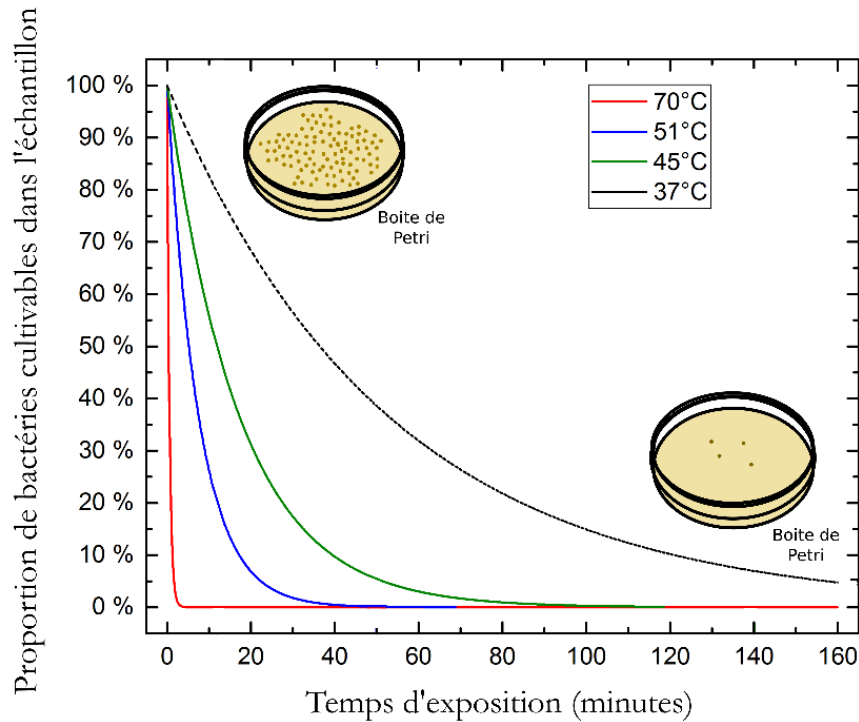


Fig. VI.4 – Effet de la température sur la cultivabilité de la bactérie *E. coli*. Proportion de bactéries cultivables après avoir été soumises à des températures de 37°C (courbe noire), 45°C (courbe verte), 51°C (courbe bleue) et 70°C (courbe rouge) pour différents temps d'exposition. La courbe à 37°C apparaît en pointillés car elle a été calculée à partir des trois autres courbes. Les boîtes de Pétri types obtenues après 24h d'incubation à 37°C sont aussi représentées pour des temps d'exposition faibles et forts.

On observe sur cette figure la décroissance de la population bactérienne dans les échantillons soumis au stress thermique. Cette diminution de bactéries cultivables intervient d'autant plus rapidement que la température est grande. La proportion de bactéries cultivables dans l'échantillon chute en dessous des 0,1% après 3,75 minutes à 70°C, 51,9 minutes à 51°C et 118,5 minutes à 45°C. Cette méthode, assez lourde à mettre en place, permet donc de déterminer de manière fiable la quantité de bactéries cultivables dans un échantillon.

Plusieurs paramètres décrivent la décroissance de la proportion de bactéries cultivables soumises à un stress thermique [ref 5]. Le temps de réduction décimal D_x représente le temps nécessaire pour réduire le nombre de bactéries d'un facteur dix à une température x donnée dans l'échantillon. Il s'exprime de la manière suivante, avec t le temps, N_0 et N le nombre initial et le nombre final de micro-organismes :

$$D_x = \frac{t}{\log(N_0) - \log(N)} \quad [38]$$

Pour chaque température x la proportion de bactéries cultivables sera donc réduite à 10% après le temps D_x et à 1% après deux fois le temps D_x . Les valeurs expérimentales de ce paramètre aux températures d'intérêt sont les suivantes : $D_{45} = 39,5 \text{ min}$, $D_{51} = 17,3 \text{ min}$ et $D_{70} = 1,25 \text{ min}$. Ce sont ces paramètres qui ont été utilisés pour construire la **Fig. VI.4**. La courbe à 37°C n'est pas le résultat d'une mesure. Elle est déduite des trois autres courbes grâce au paramètre z :

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log(D_{T_1} - D_{T_2})} \quad [39]$$

Ce paramètre peut être calculé à partir de deux points de mesures à deux températures T_1 et T_2 et de la valeur de temps de réduction décimal qui leur est associé (D_{T_1} et D_{T_2}). Pour plus de précision, il a été calculé grâce à la pente de la courbe représentant le temps de réduction décimal en fonction de la température pour un minimum de trois points de mesure. Le paramètre z représente la hausse de température nécessaire pour réduire le paramètre D_x d'un facteur dix. Il vaut dans nos conditions expérimentales 16,7°C. Grâce à ce paramètre nous pouvons calculer n'importe quelle valeur de D_x et par conséquent nous pouvons décrire la décroissance de la population bactérienne représentée **Fig. VI.4** :

$$N(t) = N_0 10^{-\frac{t}{D_x}} \quad [40]$$

La décroissance de la population bactérienne exposée à une température de 37°C est liée au stress induit par l'absence de nutriments dans le milieu. Il est également dû au stress osmotique des bactéries qui se trouvent dans un milieu hypotonique (eau déionisée). Cependant, le fait que 37°C soit la température optimale de croissance n'est pas prise en compte dans le calcul de la courbe noire de la **Fig. VI.4**. Elle représente toutefois le cas le plus favorable pour des températures supérieures strictement à 37°C.

A partir du paramètre D_x on peut évaluer le nombre de bactéries cultivables dans l'échantillon au moment du prélèvement. La **Fig. VI.5** illustre la décroissance de ce nombre jusqu'à disparition complète des bactéries de l'échantillon.

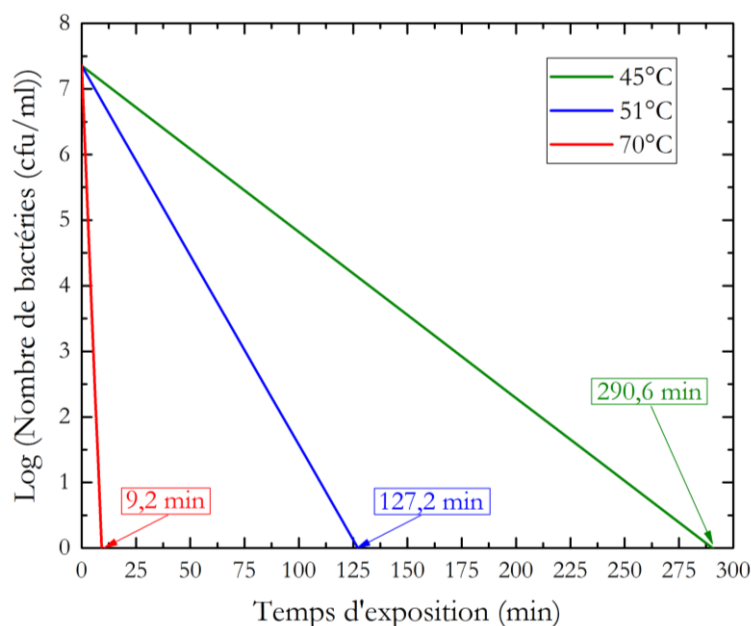


Fig. VI.5 – Décroissance du nombre de bactéries dans l'échantillon initial pour les échantillons soumis aux températures : 45°C, 51°C et 70°C. Le nombre initial a été homogénéisé ($2,25 \cdot 10^7$ ufc/mL).

On peut déduire de ces courbes le temps d'exposition qui correspond à l'extinction totale des bactéries de l'échantillon pour chaque température de stress. Il faut donc 9,2 minutes pour supprimer l'ensemble des bactéries *E.coli* de l'échantillon à 70°C, 127,2 minutes à 51°C et 290,6 minutes à 45°C dans ces conditions expérimentales.

Cette méthode de caractérisation de l'effet de la température sur la cultivabilité des bactéries, couramment utilisée en laboratoire de microbiologie, présente de nombreux désavantages. Elle est en effet longue à implémenter (dilutions et incubation 24h à température optimale de croissance) et requiert une quantité importante de consommables (dilutions, boîtes de Pétri, cônes et anses). Elle est de plus contraignante car elle requiert un grand nombre d'étapes en un temps restreint, ce qui peut nécessiter la présence de deux expérimentateurs. Nous avons donc souhaité évaluer la capacité de notre dispositif de piégeage optique face à cette problématique de la mesure de l'effet de la température sur les bactéries.

A. 3. Méthode d'analyse optique

Dans cette partie sera présentée la méthode optique d'analyse de l'état bactérien basée sur la configuration à deux lasers de notre dispositif. Cette configuration est rappelée **Fig. VI.6a** et **Fig. VI.6b**.

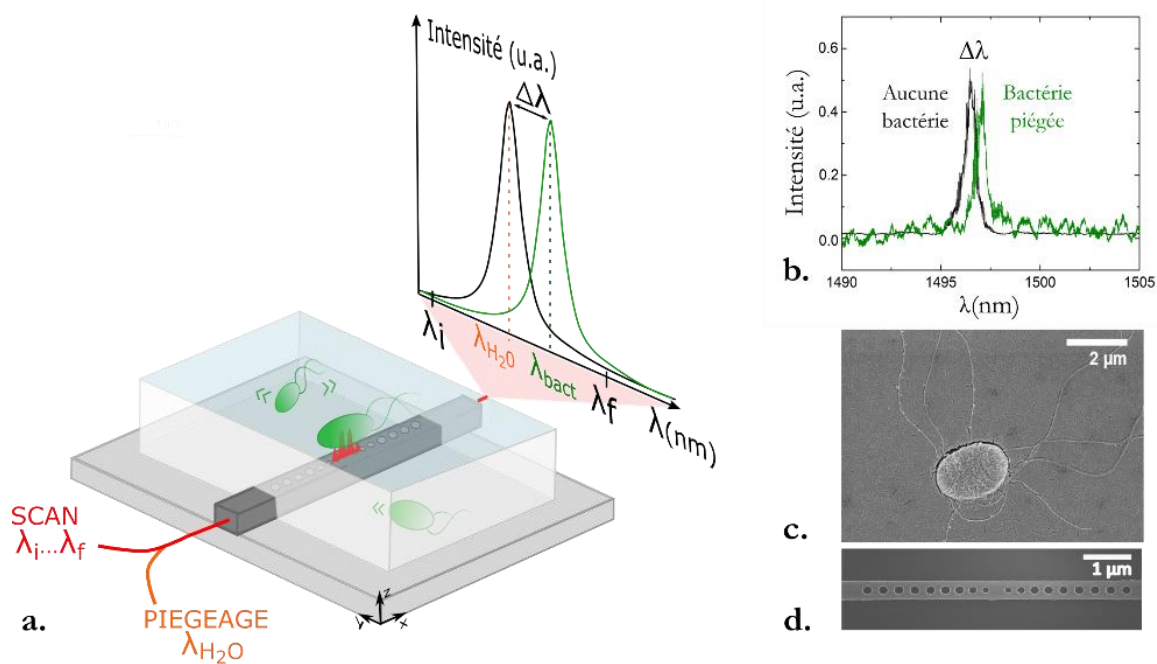


Fig. VI.6 – a. Dispositif de piégeage, configuration à deux lasers. b. Mesures expérimentales du décalage en longueur d'onde de résonance de la microcavité ($\Delta\lambda = \lambda_{rés.mesure} - \lambda_{rés.EDI}$) observé lors du piégeage d'une bactérie *E. coli*. Cette étude a été réalisée sur *E. coli* (c) piégée sur un unique cristal photonique 1D CMT5 (d).

Les objectifs et les conditions expérimentales sont identiques à celles du **Paragraphe A. 2**. L'état de la bactérie *E. coli* (souche ATCC 11775, **Fig. VI.6c**) est déterminé lorsqu'elle est soumise à un stress thermique (45°C, 51°C et 70°C) ou en conditions optimales (37°C). L'ensemble des piégeages et des mesures est effectué avec une unique structure à cristal photonique 1D à cavité CMT5 de facteur de qualité $Q=3000$ (**Fig. VI.6d**). Le protocole est exposé ci-dessous.

Protocole

Un volume de 50 mL de suspension bactérienne à 3 McF dans de l'eau déionisée filtrée a été soumis indépendamment aux températures d'intérêt dans une étuve pendant 3h. Toutes les 15 à 20 minutes, quelques microlitres de cette suspension bactérienne ont été prélevés pour être déposés dans la puce optofluidique à température ambiante (25°C). Les piégeages et mesures ont tous été réalisés à température ambiante afin de s'affranchir des contraintes liées à la dépendance de la longueur d'onde de résonance de la microcavité à la température (**Chapitre III, Paragraphe B. 2. b.**). Entre 10 et 20 piégeages de bactéries indépendantes ont été réalisés sur chaque intervalle de temps. Pour chacun d'entre eux, le décalage en longueur d'onde de la cavité dû à la présence des bactéries piégées $\Delta\lambda$ a été mesuré. Ce paramètre étant très lié aux variations de conditions expérimentales (température, remplissage des miroirs) une mesure de la longueur d'onde de résonance de la microcavité est effectuée avant et après chaque piégeage.

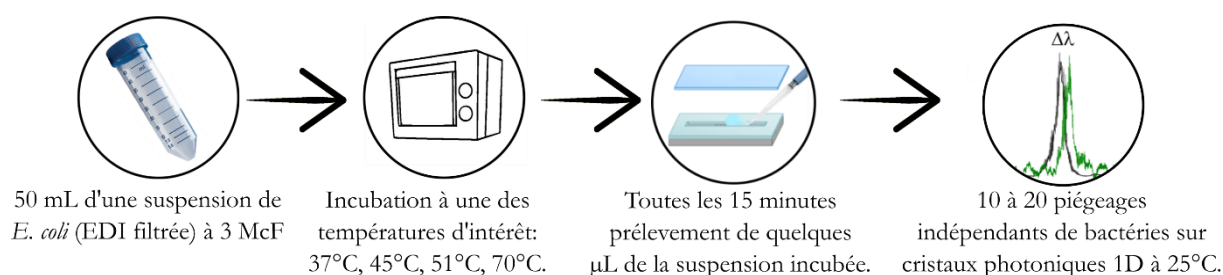


Fig. VI.7 – Protocole expérimental basé sur le piégeage optique permettant de déterminer l'influence de la température sur les bactéries.

Ce protocole permet donc d'étudier des bactéries tout au long de leur exposition à une température stressante ou non. Nous effectuons 10 à 20 piégeages indépendants à température ambiante toutes les 15 à 20 minutes et calculons pour chacun d'entre eux le paramètre $\Delta\lambda$. Ce paramètre, présenté au **Chapitre III, Paragraphe B. 2. a.** représente le décalage de la longueur d'onde de résonance de la structure optique de piégeage en absence ou en présence de bactéries piégées. Un exemple de décalage $\Delta\lambda$ est représenté **Fig. VI.6b** (mesures expérimentales).

On désigne par le terme « bactéries saines » les bactéries qui ont été conservées à 37°C par opposition à celles qui ont subi un stress thermique. Le décalage $\Delta\lambda$ moyen occasionné par la présence d'une bactérie saine piégée a été évalué à $\Delta\lambda_1 = 0,171 \pm 0,043$ nm sur 58 mesures indépendantes de bactéries de cultures différentes.

1. Indice optique de la bactérie piégée

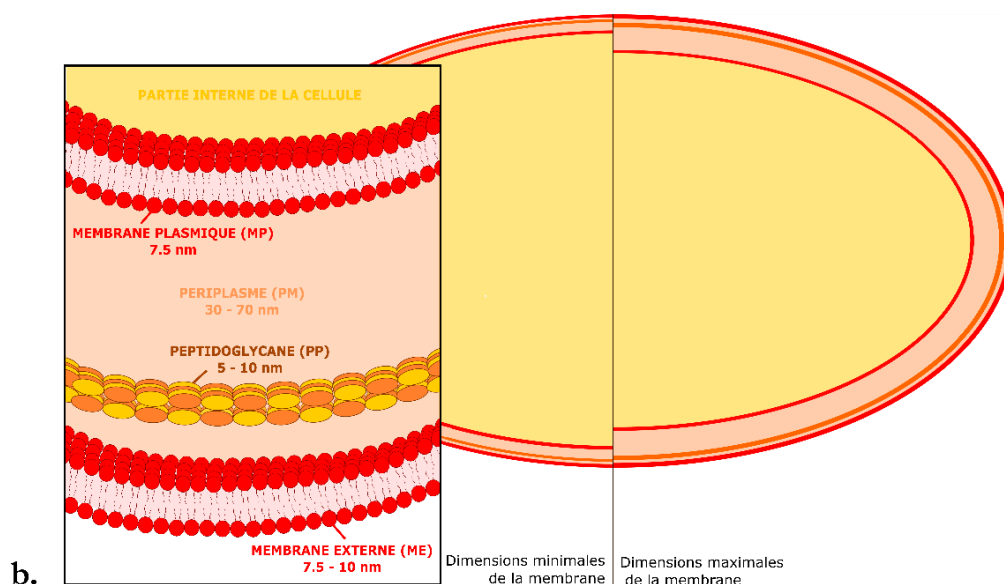
Nous avons montré au **Chapitre III** le lien entre ce décalage en résonance de la cavité et l'indice optique de l'objet piégé au travers de la modélisation numérique et de la construction de l'abaque de la **Fig. III.12**. Ici, à partir du décalage en longueur d'onde mesuré, l'indice de la bactérie piégée est calculé. Cet indice dépend de l'altitude de la bactérie, qui reste inconnue. Dans le tableau de la **Fig. VI.8a** sont représentées les valeurs d'indice moyen d'une bactérie saine piégée suivant son altitude. Ces valeurs d'indice optique sont valables à la longueur d'onde de 1,5 μm et sont donc en deçà des valeurs d'indice dans le visible (**Chapitre III, Paragraphe B. 2.**). Nous avons précédemment mis en lumière que la distance d'interaction bactérie-champ était de 80 nm au maximum. Cette épaisseur correspond principalement à la membrane bactérienne décrite au **Chapitre IV, Paragraphe A. 3**. Dans le cas d'*E. coli*, bactérie à Gram-négatif, cette structure membranaire est présentée avec plus de détail **Fig. VI.8b**. Les dimensions minimales et maximales des différentes parties de cette structure membranaire y sont représentées. Suivant l'altitude de la bactérie piégée,

l'épaisseur de membrane sondée varie. Les différentes parties de la structure membranaire sondées lors du piégeage en fonction de l'altitude de la bactérie piégée sont également indiquées dans le tableau de la **Fig. VI.8a**.

Altitude de la bactérie piégée	0 nm	20 nm	50 nm
Indice de la membrane bactérienne	$1,334 \pm 0,001$	$1,337 \pm 0,002$	$1,347 \pm 0,005$
Zone maximale sondée *	ME, PM, PP, MP et partie interne (35 nm)	ME, PM, PP, MP et partie interne (15 nm)	ME, PM, PP
Zone minimale sondée *	ME, PM, PP	ME, PM, PP	ME, PM, PP

a.

* ME indique la membrane externe, PM le périplasme, PP le peptidoglycane et MP la membrane plasmique.



b.

Fig. VI.8 – a. Tableau représentant l'indice de la membrane bactérienne d'une bactérie saine. Ces valeurs d'indice ont été calculées à partir des calculs numériques précédents et de l'abaque **Fig. III. 12**, considérant la bactérie à des altitudes de 0 nm, 20 nm et 50 nm. La précision de ces résultats est donnée avec une résolution de 10^{-3} . Les différentes parties de la structure membranaire bactérienne en interaction avec le champ de la microcavité sont également données. Elles dépendent de l'épaisseur de ces différentes parties (**Fig. VI.8b**) et de l'altitude de la bactérie piégée. La zone maximale sondée (interaction champ-bactérie) est calculée pour les dimensions minimales des structures membranaires tandis que la zone minimale sondée est calculée pour les dimensions membranaires maximales. **b.** Représentation de la structure membranaire des bactéries à Gram-négatif. Les dimensions minimales et maximales des différentes parties de la membrane sont également représentées. Les dimensions sont représentées à l'échelle.

Le paramètre de décalage de la résonance $\Delta\lambda$ étant dépendant de la structure optique utilisée, nous avons fait le choix d'analyser les résultats obtenus avec la méthode de piégeage optique en mettant en regard les mesures de $\Delta\lambda$ et d'indice optique des bactéries piégées. Ces résultats sont présentés **Fig. VI.9** de manière détaillée et le seront également **Fig. VI.11** de manière plus synthétique. Les valeurs d'indice données sur ces figures ont été calculées en fixant arbitrairement l'altitude de la bactérie à 50 nm et sa position au centre du piège. Le piégeage étant réversible nous pouvons exclure le contact (distance bactérie-microcavité de 0 nm) qui pourrait faire intervenir des forces d'adhésion de contact [ref 6] et amener les bactéries piégées à adhérer

définitivement à la structure silicium. Comme nous avons montré que la bactérie piégée conservait un mouvement dans le plan xy (**Chapitre V, Paragraphe A. 1.**), il est probable qu'elle conserve également un déplacement dans la direction verticale (z). L'altitude de la bactérie dans le piège varie donc certainement entre 0 (exclu) et 80 nm. Nous avons choisi de calculer les valeurs d'indice en supposant la bactérie à 50 nm d'altitude afin de moyenner ces déplacements. A partir de l'abaque de la **Fig. III. 12**, la valeur d'indice correspondant à la membrane d'une bactérie saine est donc évaluée à $n_{\Delta 1}=1,347\pm0,005$.

2. Résultats

Sur la **Fig. VI.9** les courbes correspondant à la décroissance de la proportion de bactéries dans l'échantillon en fonction du temps d'exposition sont montrées en regard des résultats de variation de longueur d'onde de résonance et d'indice optique de bactéries piégées.

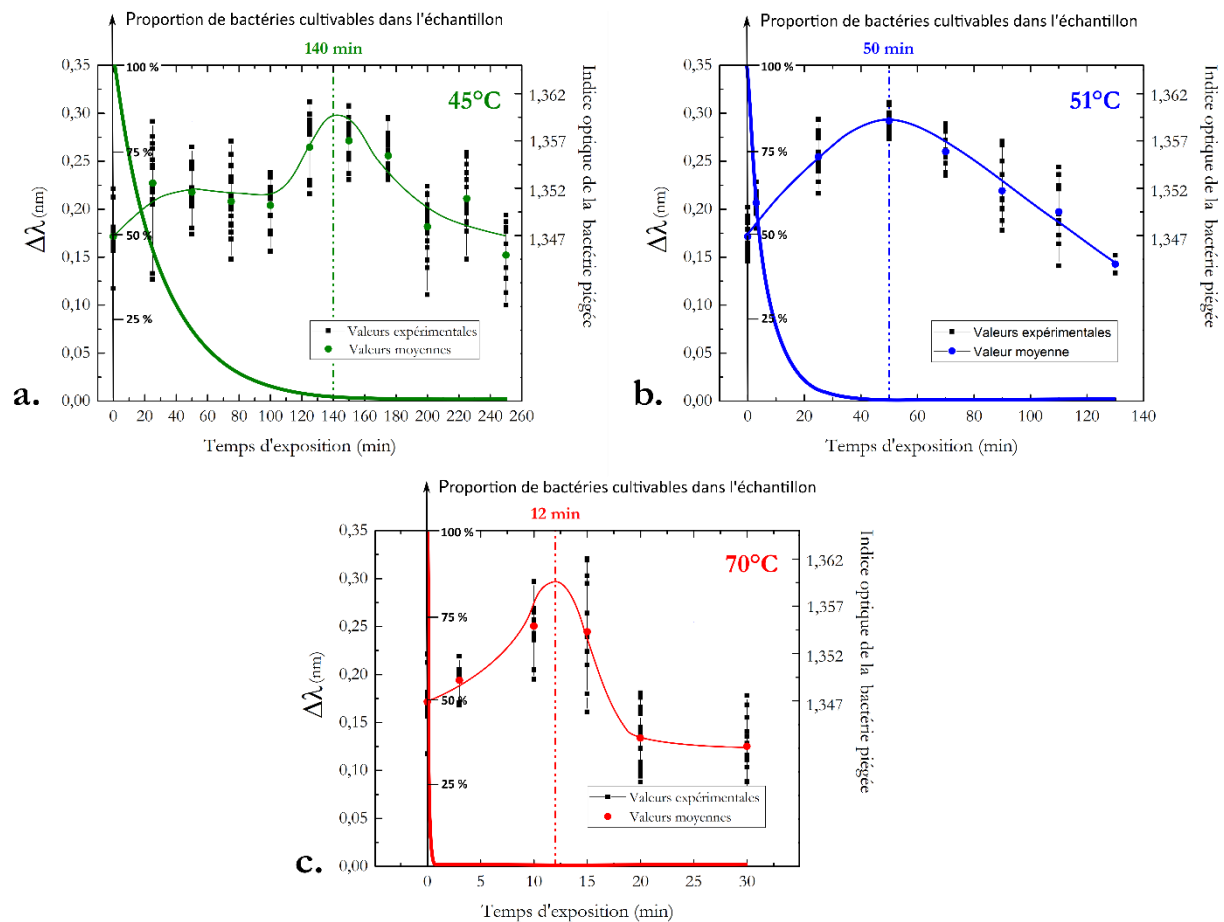


Fig. VI.9 – Évolution du décalage en longueur d'onde de résonance de la microcavité moyen $\Delta\lambda$ occasionné par le piégeage de bactéries *E. coli*. Ces bactéries ont été soumises à des températures de 45°C (a), 51°C (b) ou 70°C (c). La diminution de la proportion de bactéries cultivables dans l'échantillon en fonction du temps d'exposition est également représentée, calculée à partir de la méthode présentée au paragraphe précédent (A.2). L'axe de droite représente la valeur d'indice optique de l'objet piégé calculée à partir de la modélisation numérique présentée **Chapitre III, Paragraphe B.2. a**.

Pour les températures de stress de 45°C, 51°C et 70°C trois étapes sont observées. $\Delta\lambda$ (et donc l'indice optique de la membrane de la bactérie piégée) augmente, puis diminue pour finalement se stabiliser. Plus la température à laquelle la bactérie est soumise est importante, plus l'indice membranaire augmente

rapidement. Quelle que soit la température de stress, le décalage maximal de la longueur d'onde de résonance de la microcavité est d'environ 0,30 nm, ce qui correspond à un indice membranaire de 1,360. Ce maximum est atteint après 12 minutes à 70°C, 50 minutes à 51°C et 140 minutes à 45°C. La courbe à 37°C ne présente pas de variations aussi importantes et peut être considérée comme une référence.

La durée de chaque manipulation expérimentale dépend de la température à laquelle les bactéries ont été soumises. A 37°C et 45°C, l'expérimentation a pu être menée durant 250 minutes, tandis qu'elle a été menée durant 130 minutes à 51°C et 30 minutes à 70°C. Bien que visuellement toujours intègres, les bactéries n'ont pas pu être piégées après ces durées aux deux plus hautes températures. Ces résultats sont à corrélérer avec ceux de la **Fig. VI.5** sur la décroissance du nombre de bactéries cultivables dans l'échantillon. Il semblerait donc bien que les bactéries que nous ne sommes plus capables de piéger ne sont plus cultivables et sont probablement mortes.

L'ensemble des résultats présentés **Fig. VI.8** et **Fig. VI.9** montre que le stress thermique a une influence directe sur l'indice optique membranaire des bactéries. Ces résultats sont appuyés par les images en microscopie à balayage électronique (MEB) que nous avons effectuées et qui sont montrées **Fig. VI.10**. On peut y observer l'effet de la température (exposition à 70°C pendant 30 minutes en milieu aqueux) sur l'aspect externe des bactéries *E. coli*, *S. epidermidis*, *L. innocua* et *B. subtilis*. On peut y voir une dégradation de la structure membranaire rigide pour les bactéries *E. coli*, *L. innocua* et *B. subtilis*. Les bactéries *S. epidermidis* semblent présenter une meilleure résistance aux hautes températures.

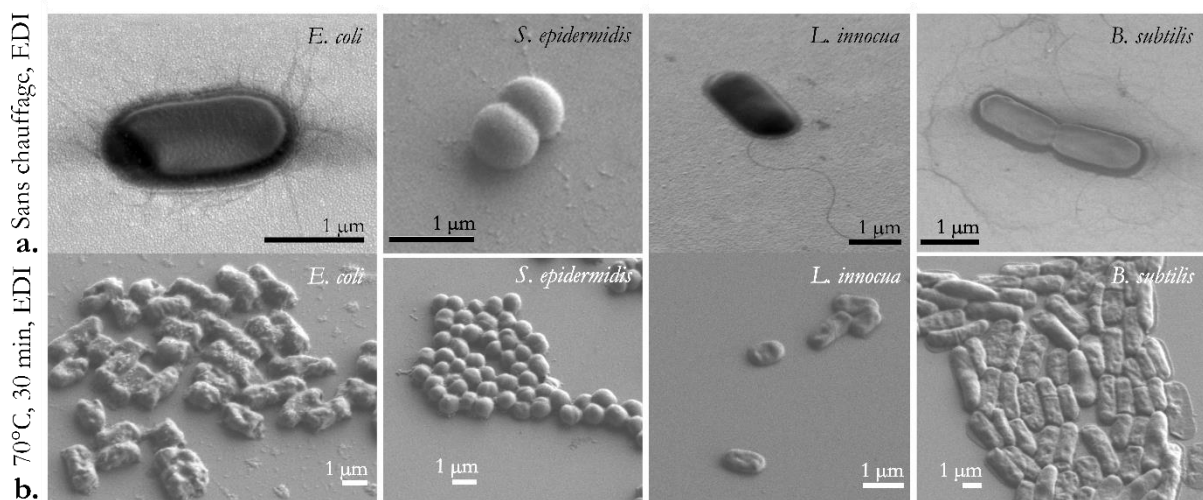


Fig. VI.10 - Images MEB de bactéries *E. coli* (ATCC 11775), *S. epidermidis* (ATCC 14990), *L. innocua* (ATCC 33090) et *B. subtilis* (ATCC 11774) initialement en suspension dans de l'EDI. Ces bactéries ont été cultivées en condition normales (a) ou chauffées à 70°C pendant 30 minutes (b).

La littérature montre que le stress thermique chez *E. coli* entraîne une modification de la composition membranaire liée au stress oxydatif [ref 7-9] détaillé au **Chapitre IV, Paragraphe E**. Les bactéries évoluent alors d'un état viable et cultivable à un état viable mais non cultivable. Un mécanisme de lyse vient ensuite dégrader la membrane bactérienne. Nous interprétons les trois étapes observées **Fig. VI.9** comme correspondant à ces différents mécanismes. L'augmentation de l'indice membranaire correspond à l'oxydation de la membrane tandis que le mécanisme de lyse entraîne une diminution de l'indice de la membrane qui va se gorger d'eau. Lorsque le processus de lyse devient trop avancé il devient impossible de piéger les bactéries dont l'indice est trop proche de celui du milieu dans lequel elles sont en suspension. La force de gradient qui permet de piéger des objets dépend du contraste d'indice entre l'objet et le milieu

environnant. Ce phénomène peut donc expliquer pourquoi nous ne pouvons plus piéger *E. coli* après 130 minutes à 51°C et 30 minutes à 70°C.

En comparant la méthode d'analyse optique à la méthode d'analyse de microbiologie (A.2.) nous montrons **Fig. VI.9** que le sommet des courbes à 45°C, 51°C et 70°C peut être relié à la cultivabilité des bactéries. En effet le maximum de variation d'indice membranaire est enregistré systématiquement lorsque moins de 0,1% des bactéries sont encore cultivables dans l'échantillon. Ce type d'information pourrait être utilisé dans l'établissement de procédures de stérilisation puisqu'elle indique directement le temps de chauffage adéquat pour détruire des populations bactériennes.

La **Fig. VI.11** permet de synthétiser l'ensemble des mesures et des observations que nous avons pu réaliser jusqu'ici. Elle permet également de comparer les mesures effectuées à des températures stressantes (45°C, 51°C et 70°C) à d'autres mesures de $\Delta\lambda$ effectuées à 37°C.

La variabilité des mesures de $\Delta\lambda$ observée à 37°C est de $0,042 \pm 0,027$ nm (amplitude \pm écart type). Ce phénomène a également été observé à $t = 0$ minute pour toutes les courbes expérimentales dont l'ordonnée à l'origine a été ramenée à la valeur moyenne $\Delta\lambda_1$ pour une meilleure lisibilité. Cette variabilité peut être due à la fois à la variabilité phénotypique intrinsèque inhérente aux bactéries, à un biais de mesure optique ou à la variabilité d'altitude de piégeage présentée précédemment. On retrouve cette variabilité dans la dispersion des mesures représentées **Fig. VI.9**.

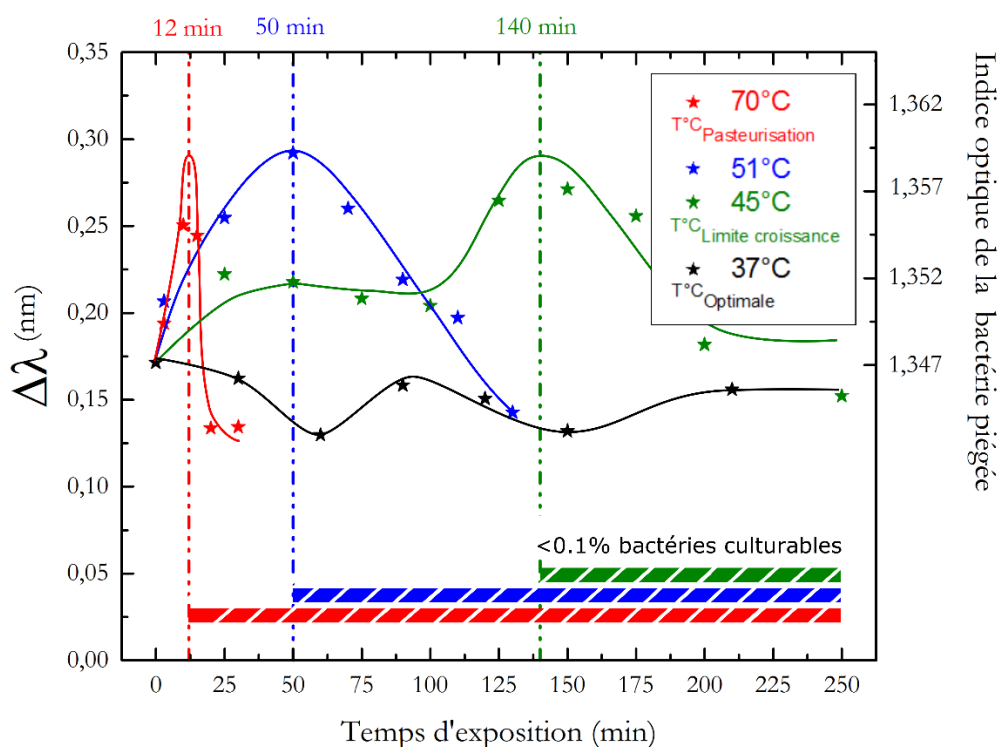


Fig. VI.11 – Évolution du décalage en longueur d'onde de résonance de la microcavité moyen $\Delta\lambda$ occasionné par le piégeage de bactéries *E. coli*. Ces bactéries ont été soumises à des températures de 37°C, 45°C, 51°C ou 70°C. Seule la valeur moyenne des 10 à 20 mesures par temps d'exposition est représentée ici. Les valeurs d'indice optique sont calculées à partir des calculs numériques et de l'abaque **Fig. III.8** en fixant l'altitude de la bactérie piégée à 50 nm. L'axe de droite représente la valeur d'indice optique de l'objet piégé calculée à partir de la modélisation numérique présentée **Chapitre III, Paragraphe B.2. 1**. La proportion de bactéries cultivables est également représentée aux différentes températures, déduites de la **Fig. VI.4**.

3. Dispersion des mesures

Nous avons souhaité approfondir cette problématique de la variabilité des mesures de $\Delta\lambda$ observée **Fig. VI.9** et **Fig. VI.11**. La dispersion dans les mesures que nous observons peut-elle venir d'un biais expérimental dans la mesure de la figure de résonance de la structure optique ? La longueur d'onde de résonance des cristaux photonique étant dépendante de la température (**Chapitre III, Paragraphe B. 2. b.**), des variations très locales de température dans le cristal peuvent-elles entraîner cette dispersion dans nos mesures ? Nous n'avons pas le recul suffisant pour connaître l'élévation de température dans la microcavité lorsque nous injectons des puissances typiques de piégeage (10-16 mW en sortie de laser). De même, la température de la pièce dans laquelle le dispositif se trouve peut varier au cours de l'expérimentation.

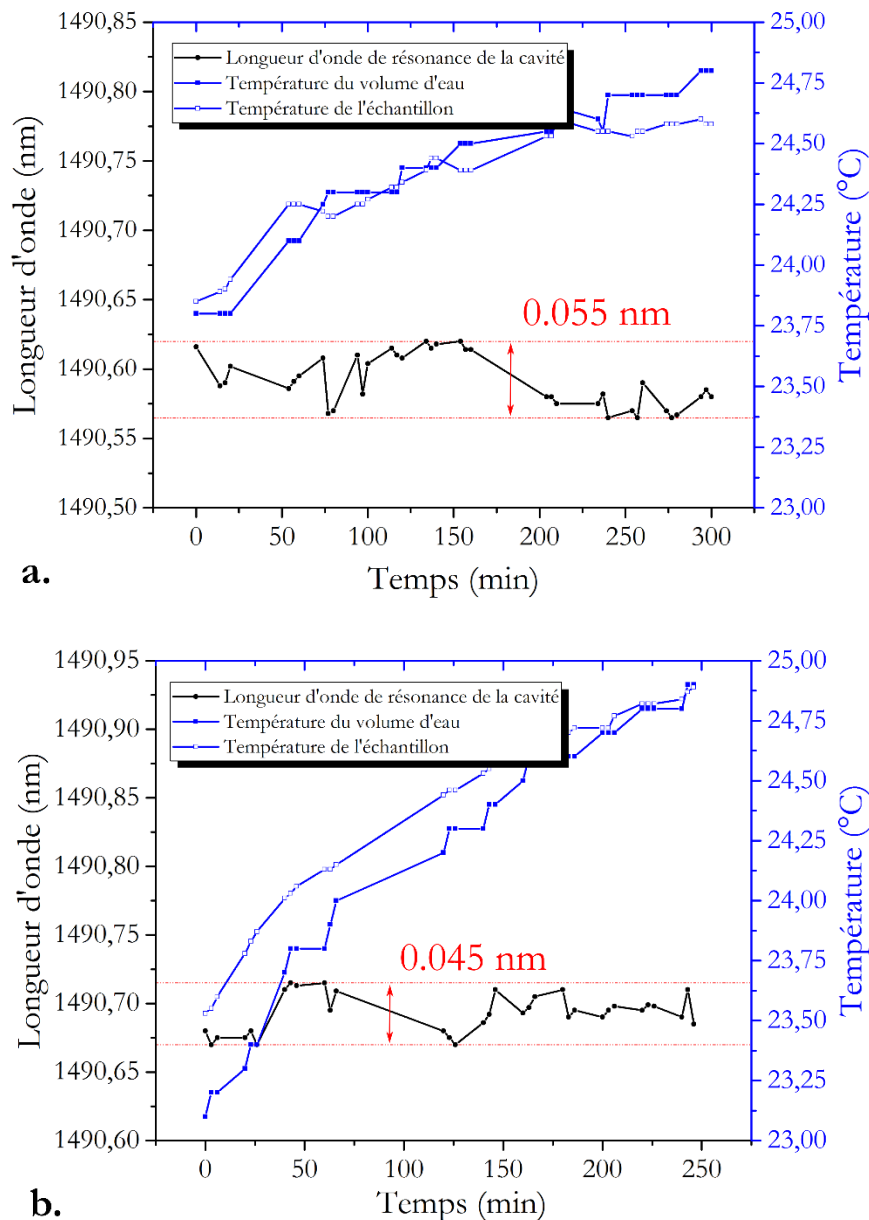


Fig. VI.12 – Mesures de température d'un échantillon d'eau et de l'échantillon optique (puce optofluidique) pendant 250 minutes (en bleu). En parallèle, la longueur d'onde de résonance d'une cavité CMT3 est également mesurée toutes les 20 minutes. Ces mesures ont été effectuées sur deux jours différents pour des puissances injectées dans la structure optique de 2 mW (a) et 10 mW (b).

Afin de mettre en évidence le rôle de ces variations de température sur la résonance des structures de piégeage nous avons effectué des manipulations complémentaires. Nous avons effectué deux mesures de température en parallèle : celle de l'échantillon (puce optofluidique, structure immergée dans l'EDI) et celle d'un volume d'eau situé à proximité de l'échantillon. La température de l'échantillon a été mesurée par le biais du porte échantillon monitoré en température qui permet à la fois d'imposer une température ou de mesurer celle de l'échantillon. Nous avons mesuré ces températures toutes les 20 minutes pendant près de 250 minutes, ce qui correspond à un temps classique pour nos mesures expérimentales de l'influence de la température sur les bactéries (**Fig. VI.9, Fig. VI.11**). A tous ces temps de mesure nous avons également mesuré la longueur d'onde de résonance d'une cavité CMT3. Ce protocole expérimental a été répété deux jours différents à des puissances injectées différentes : 2 mW et 10 mW (en sortie de laser) pour étudier l'influence de la puissance injectée. Les résultats de ces expérimentations sont montrés **Fig. VI.12**.

On observe tout d'abord une augmentation constante de la température de l'échantillon et du volume d'eau situé à proximité de l'échantillon. Cela correspond à l'augmentation de la température de la pièce dans laquelle se trouve le dispositif de piégeage. Le fonctionnement de l'ensemble des appareils nécessaires au piégeage dégage en effet de la chaleur, entraînant une augmentation de la température de 1°C à 2°C en 5h. Malgré cette augmentation croissante de température de l'échantillon, la longueur d'onde de résonance de la structure optique étudiée reste stable dans le temps. Pour une puissance injectée de 2 mW, la longueur d'onde de résonance de la structure est centrée autour de 1490,59 nm avec une variabilité maximale de l'ordre de 0,055 nm. A 10 mW, la longueur d'onde de résonance est centrée autour de 1490,69 nm avec une variabilité maximale de l'ordre de 0,045 nm. L'injection d'une puissance plus importante peut expliquer cette augmentation de la longueur d'onde de résonance moyenne de l'ordre de 0,10 nm. Cependant nous observons que cela ne modifie pas la variabilité des mesures dont la valeur moyenne est 0,050 nm.

Si nous comparons cette variabilité à celle des mesures optiques de $\Delta\lambda$ obtenues à 37°C sur la **Fig. VI.11**, nous observons que la contribution des mesures optiques dans la variabilité des résultats est importante et semble être la principale cause de la variabilité observée. Nous avons représenté la part de dispersion dans les mesures qui peut être due à la mesure optique de longueur d'onde de résonance sur la **Fig. VI.13**. Cette figure permet de montrer la dispersion des mesures pour toutes les températures et montre donc la contribution des mesures optiques dans la variabilité des résultats.

La variabilité de $0,042 \pm 0,027$ nm sur les mesures de $\Delta\lambda$ à 37°C s'explique donc par la variabilité de la mesure optique de la longueur d'onde de résonance de la microcavité qui est de l'ordre de 0,045 nm à la puissance de piégeage. Cette variabilité peut être due à des variations extrêmement locales de température au sein de la microcavité, ou à une légère variation du remplissage des trous du cristal photonique. Il est important de préciser que cette variabilité ne remet pas en question les résultats présentés dans ce chapitre sur la variation de l'indice optique de bactéries soumises à un stress thermique.

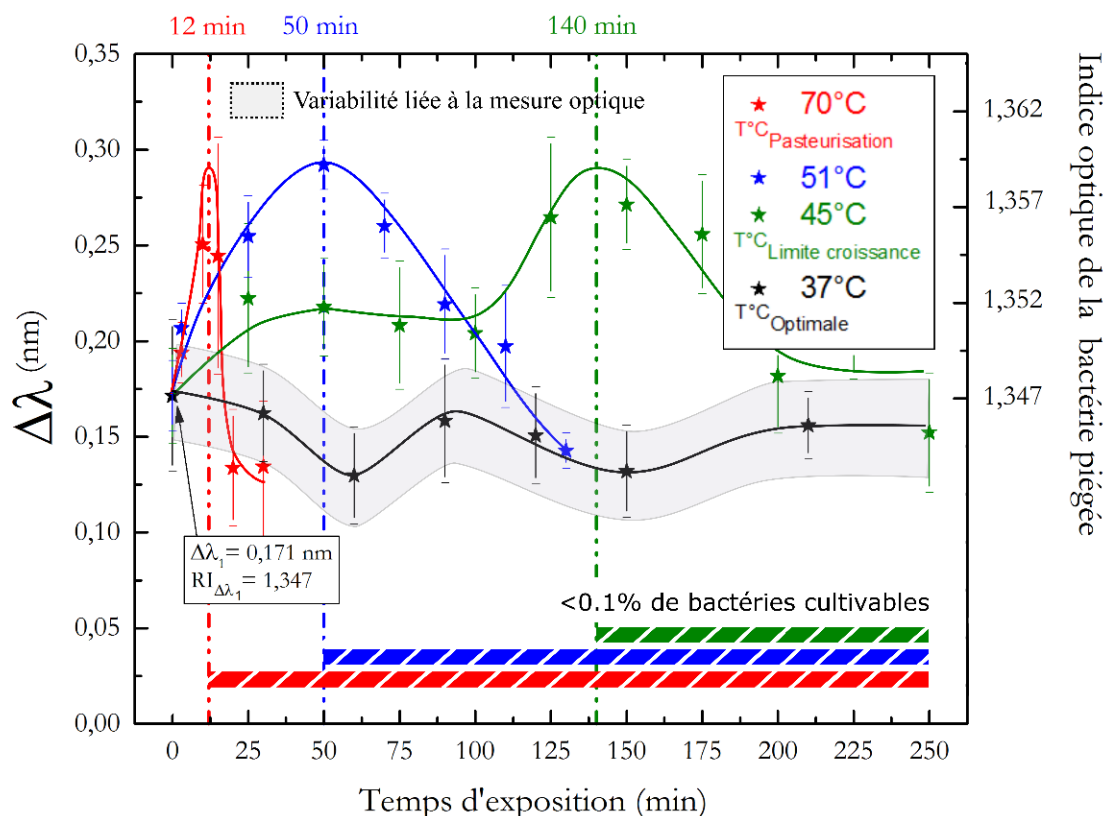


Fig. VI.13 –Évolution du décalage en longueur d'onde de résonance de la microcavité $\Delta\lambda$ occasionné par le piégeage de bactéries *E. coli* lorsqu'elles sont soumises à des températures de 37°C, 45°C, 51°C ou 70°C. Les résultats sont présentés sous la forme valeur moyenne \pm écart type. Les valeurs d'indice optique sont calculées à partir des calculs numériques et de l'abaque **Fig. III.8** en fixant l'altitude de la bactérie piégée à 50 nm. L'axe de droite représente la valeur d'indice optique de l'objet piégé calculée à partir de la modélisation numérique présentée **Chapitre III, Paragraphe B.2.1**. La proportion de bactéries cultivables est également représentée aux différentes températures, déduites de la **Fig. VI.4**. La contribution des mesures optiques dans la variabilité des résultats est représentée en gris sur la courbe à 37°C.

En effet les variations de longueur d'onde de résonance de la cavité enregistrées lors de l'évolution de l'état des bactéries piégées au cours de leur exposition à la température sont au moins deux fois plus importantes. De plus, la tendance des courbes à 45°C, 51°C et 70°C est toujours la même (augmentation puis réduction du décalage $\Delta\lambda$) et non aléatoire comme celle des mesures de résonance de la **Fig. VI.12**. La **Fig. VI.14** illustre bien la pertinence des mesures effectuées malgré la variabilité des mesures optiques sur l'exemple du stress thermique à 51°C.

On observe également qu'il existe une légère variabilité qui ne s'explique pas par celle des mesures optiques, surtout après 80 minutes de stress thermique. Cette variabilité est très certainement due à la variabilité phénotypique intrinsèque inhérente aux bactéries qui peuvent présenter une réponse différente au stress thermique. Sur la **Fig. VI.13**, on observe également ce phénomène à 70°C. Il est moins marqué à 45°C et totalement absent à 37°C. Il est donc difficile de conclure sur les raisons de cette variabilité supplémentaire mais cette explication nous semble la plus vraisemblable.

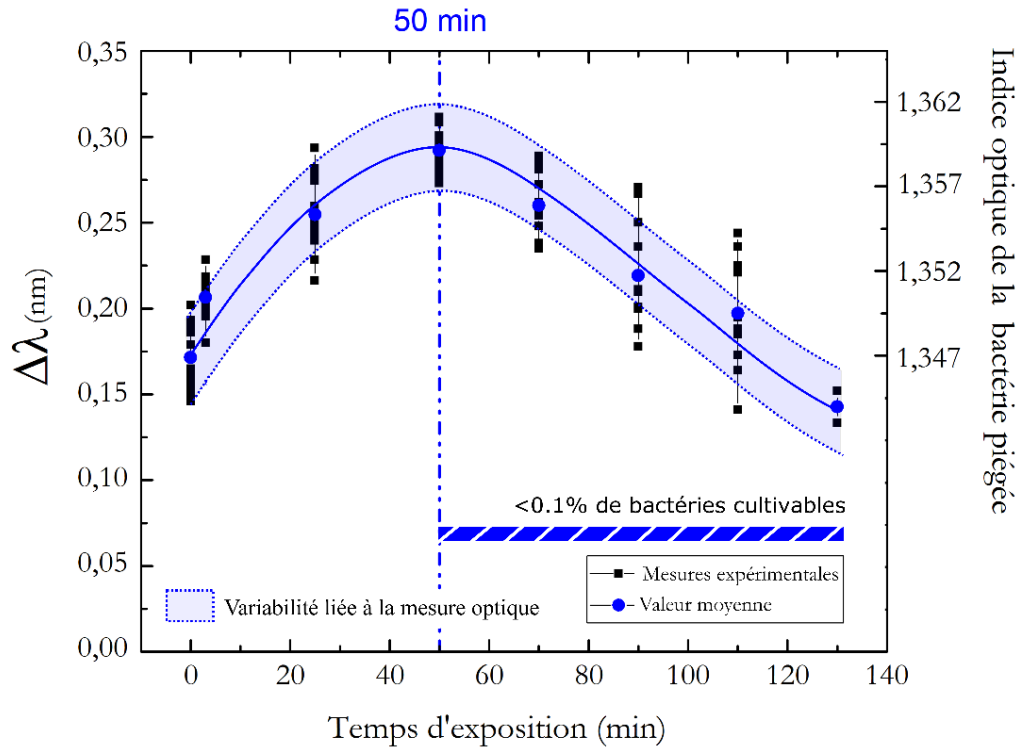


Fig. VI.14 –Évolution du décalage en longueur d'onde de résonance de la microcavité moyen $\Delta\lambda$ occasionné par le piégeage de bactéries *E. coli* soumise à une température de 51°C. Les valeurs d'indice optique sont calculées à partir des calculs numériques et de l'abaque **Fig. III.8** en fixant l'altitude de la bactérie piégée à 50 nm. La contribution des mesures optiques dans la variabilité des résultats est représentée en fond bleu sur la courbe.

Finalement, la méthode d'analyse optique offre des informations plus complètes que la méthode d'analyse de microbiologie. En effet cette dernière donne une information binaire sur l'état cultivable/non-cultivable des bactéries. La méthode optique donne des informations sur l'évolution de l'état de la bactérie tout au long du processus d'exposition au stress thermique. Elle pourrait également renseigner sur l'état viable mais non cultivable qui est un sujet d'étude majeur aujourd'hui [ref 10-11]. Cet état caractérise les bactéries qui ne se divisent pas mais qui sont viables et seront cultivables dans un environnement plus propice. La détection de telles bactéries est aujourd'hui impossible à réaliser avec les méthodes traditionnelles de microbiologie qui reposent essentiellement sur la détection par la culture bactérienne. Les états intermédiaires mis en lumière par la méthode d'analyse optique permettraient donc d'obtenir des informations sur la viabilité des bactéries, indépendamment de leur cultivabilité.

A. 4. Conclusion

Nous montrons ici la pertinence de l'utilisation des cristaux photoniques pour le suivi de l'état bactérien dans un contexte de bactéries soumises à un stress thermique. L'interaction des bactéries piégées avec la partie évanescence du champ d'une microcavité permet une fine inspection de la membrane bactérienne, témoin de l'effet de la température sur la bactérie. Comparée à une méthode de caractérisation utilisée traditionnellement en microbiologie, nous avons montré les atouts de la méthode optique développée. Plus rapide et plus complète, elle permet d'accéder à une continuité d'états entre les stades viables et non viables. Cette viabilité peut être étudiée indépendamment de la cultivabilité des bactéries, ce que ne permet pas la méthode de microbiologie.

B) Conclusion

Ce dernier chapitre montre la pertinence de notre dispositif optique de piégeage pour étudier la sensibilité des bactéries à un stress thermique. Sa pertinence a été évaluée en le comparant à une méthode de microbiologie permettant d'étudier l'effet de la température sur la cultivabilité des bactéries et à une caractérisation par microscopie électronique. Nous avons également montré que la principale cause de la variabilité dans nos résultats était liée à une variabilité de la mesure de la longueur d'onde de résonance de la cavité mais que cela ne remet pas en cause nos résultats.

Nous avons choisi d'étudier l'effet d'un stress thermique sur les bactéries car l'étude de cet agent bactérien autorise de travailler dans des conditions similaires à celles avec lesquelles nous avons travaillé précédemment pour la problématique de l'identification. Cela nous permettait notamment de travailler dans l'EDI et à des échelles de temps convenables. L'étude d'autres agents antibactériens pourra être menée par la suite (javel (stress oxydatif), alcool à 70°C).

Il existe certaines contraintes expérimentales auxquelles nous avons dû faire face au cours de ces travaux de thèse. Plus la contrainte de temps est importante plus nous avons été limité par les étapes de préparation d'échantillon, de montage sur le porte échantillon et de couplage des structures optiques avec la fibre d'injection. Cela a été particulièrement le cas pour les applications de susceptibilité des bactéries à la température. Comme nous avons souhaité effectuer une vingtaine de piégeages indépendants de bactéries toutes les vingt minutes, ces étapes étaient très contraignantes. Les modifications apportées au dispositif de piégeage présentées au **Chapitre II** nous ont permis d'effectuer ces mesures dans les meilleures conditions. Cependant, à 70°C ces mesures ont été effectuées sur un temps plus limité (toutes les 5 minutes) et nous n'avons alors pu effectuer qu'une dizaine de mesures maximum par tranche de 5 minutes. Pour pallier à cette limite du système, nous avons cherché à travailler sur deux axes : le couplage optique et la microfluidique. Ces deux développements ont également été menés dans une problématique d'intégration du système. Ils sont présentés en [annexe 4](#).

Références :

- [1] *Survival and Growth Characteristics of Escherichia coli Associated with Hemorrhagic Colitis*. M. P. Doyle, J. L. Schoeni, *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 855-856 (1984).
- [2] *A Comparative Study of Preservation and Storage of Haemophilus influenza*. O. C Aulet de Saab, M. C. de Castillo, A. P de Ruiz Holgado and Olga M de Nader, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **96**, 4, 583-586 (2001).
- [3] *The role of fever in the infected host*. J. D. Hasdaya, K. D. Fairchild, C. Shanholtz, *Microbes and Infection* **2**, 1891–1904 (2000).
- [4] *The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of Escherichia coli O157:H7*. R. L. Buchanan and L. A. Klawitter, *Food Microbiology* **9**, 185-196 (1992).
- [5] *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Z. Boz, R. Uyar, & F. Erdoğdu, *Principles of Canning* 160-180 (2014).
- [6] *Adhesion Forces between E. coli Bacteria and Biomaterial Surfaces*. Y.-L. Ong, A. Razatos, G. Georgiou, and M. M. Sharma, *Langmuir* **15**, 2719-2725 (1999).
- [7] *Mechanism to control the cell lysis and the cell survival strategy in stationary phase under heat stress*. R. Noor, *SpringerPlus* **4**, 599 (2015).
- [8] *Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens*. A. M. Wesche, J. B. Gurtler, B. P. Marks, and E. T. Ryser, *Journal of Food Protection* **72**, 1121-1138 (2009).
- [9] *Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant*. Camille Migdal, Mireille Serres, *m/s* **4**, 405 (2011).
- [10] *The Viable but Nonculturable State in Bacteria*. James D. Oliver, *J Microbiol.* **93**, *Special Issue*, 93-100 (2005).
- [11] *Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health*. Y. N. Sardessai, *Current Science* **89**, 10, 25 (2005).

Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur le piégeage et l'analyse de bactéries sur cristaux photoniques 1D à microcavités linéiques et cristaux photoniques 2D à cavités creuses. La problématique adressée est celle du diagnostic bactérien au travers de l'identification bactérienne et de la susceptibilité des bactéries à des agents antibactériens.

Un des premiers enjeux de ce projet a été d'adapter les structures optiques et le dispositif au piégeage et à la manipulation d'objets biologiques. Il avait en effet été optimisé précédemment pour la manipulation de billes de polystyrène. Les modifications apportées concernent à la fois le design des cristaux photoniques, le système de microfluidique adapté aux puces photoniques mais également le dispositif d'injection et d'analyse dans sa globalité. Le système de couplage a été optimisé en termes de stabilité de la polarisation de la lumière injectée et de la position de l'échantillon. Le dispositif de visualisation a également été modifié, permettant l'observation d'objets de taille micronique, non fluorescents et de faible contraste d'indice avec le milieu environnant. Un dispositif à deux lasers a finalement été implémenté afin de monitorer la longueur d'onde de résonance des structures optiques de piégeage en temps réel, notamment pendant le piégeage de bactéries.

Deux méthodes d'analyse ont été développées au cours de cette thèse : une méthode de caractérisation spatiale reposant sur l'analyse de la trajectoire des bactéries piégées au travers du système de visualisation. La seconde est une méthode de caractérisation temporelle qui repose sur l'analyse des signaux transmis par la structure optique de piégeage. Elle permet à la fois de caractériser ces structures (influence de la température ou de l'indice du milieu) et l'interaction bactéries-cavité. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont le fruit de manipulations expérimentales qui ont été réalisées sur des cristaux photoniques 1D ou 2D. Cependant ces deux structures optiques sont tout à fait interchangeables sur notre dispositif et pourraient être utilisées de la même façon pour chacune des applications que nous présentons. Les méthodes d'analyse sont également les mêmes. Cela montre l'universalité des résultats que nous présentons ici, qui seront certainement reproductibles avec d'autres systèmes optiques de piégeage résonant présentant un facteur de qualité similaire à nos structures.

Grâce à l'ensemble de ces développements nous avons démontré le piégeage de sept espèces bactériennes différentes : *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Y. ruckeri*, *N. sicca*, *P. putida* et *L. innocua*. Le piégeage de ces bactéries permet l'analyse de certaines de leurs propriétés. Elles concernent principalement leur morphologie, leur mobilité et leur structure membranaire (type de Gram). Ces informations sont traditionnellement requises pour l'identification bactérienne. Les méthodes classiques de microbiologie pour identifier ces paramètres sont très chronophages (quelques heures à quelques jours) car elles reposent sur l'analyse d'un grand nombre d'individus et requiert donc de longues heures d'incubation pour leur culture. Elles sont également destructrices, coûteuses en agents chimiques et en consommables (boîtes de Pétri, diluant, anses, cônes, etc.). En comparaison, les avantages de la méthode que nous avons développée est qu'elle est non-destructrice, requiert moins d'une minute de piégeage, aucun agent chimique et autorise des échantillons à faible concentration de bactéries. L'ensemble des étapes d'identification ne peut pour le moment être réalisé par piégeage optique mais nous espérons que d'autres travaux pourront être effectués pour aller dans ce sens.

Le dispositif à deux lasers développé au cours de ce doctorat permet d'étudier la réponse d'une bactérie à des agents antibactériens. Nous avons montré ici le monitoring de l'état d'une bactérie *E. coli* soumise à un stress thermique. Comparée aux méthodes traditionnellement utilisées en microbiologie pour l'étude de l'influence de la température sur les bactéries, la méthode que nous proposons présente de nombreux avantages. Tout d'abord elle apporte des informations en temps réel sur l'évolution de l'état des bactéries, donnant accès à un continuum d'états entre celui de la bactérie saine et celui d'une bactérie endommagée puis morte. Les méthodes de microbiologies donnent uniquement un résultat binaire sur l'état des bactéries : elles sont dites cultivables ou non-cultivables. De plus, ce résultat ne peut être obtenu qu'après plusieurs heures de culture et requiert ici encore une quantité de main d'œuvre et de consommables impressionnante. Cette première étude sur la mesure de l'effet de la température sur les bactéries au travers du piégeage sur cristaux photoniques est extrêmement encourageante et d'autres études seront menées par la suite sur l'effet d'autres agents bactériens.

Nous avons montré que la caractérisation temporelle du piégeage de bactéries (analyse des signaux optiques de piégeage) apporte des informations sur la bactérie piégée extrêmement complètes. Nous n'avons pas exploité l'ensemble de ces informations, ce qui pourra être réalisé au cours de futurs projets. Afin de satisfaire à de nouvelles utilisations du dispositif de piégeage (piégeage d'agents pathogènes et étude de l'effet d'agents antibactériens de type antibiotique), nous avons initié un processus d'intégration du dispositif, disponible en [annexe 4](#). Cette intégration consiste à utiliser une puce optofluidique fibrée : couplage de la lumière par réseaux, collage des fibres d'injection et de collection et système de microfluidique dynamique. Ce nouveau dispositif reposera uniquement sur la méthode de caractérisation temporelle, plus complète et plus facile à intégrer que la méthode de caractérisation spatiale. Il sera transportable pour d'éventuelles expérimentations en laboratoire de microbiologie de classe 2 (bactéries pathogènes) et présentera de très faibles contraintes expérimentales, permettant à des non-spécialistes de les utiliser.

Finalement, plusieurs perspectives peuvent être envisagées à la suite à ces travaux :

🔗 Dans la problématique du diagnostic bactérien.

Une analyse plus approfondie des signaux de piégeage en corrélation avec certaines propriétés connues des bactéries (flagelle, pilli, nombre de bactéries piégées) pourrait permettre d'extraire des informations pour une identification plus complète des bactéries piégées.

La susceptibilité des bactéries aux antibiotiques pourrait également être étudiée. Des mesures préliminaires ont été effectuées sur deux antibiotiques (ampicilline et ciprofloxacine) sur quatre souches de bactéries *E. coli*. Le dispositif à deux lasers pourra être utilisé pour caractériser l'effet de ces antibiotiques (dépendance en temps et en concentration d'antibiotique) sur les bactéries *E. coli*. Cela pourra nécessiter l'utilisation du dispositif intégré.

🔗 Pour de nouvelles applications sur les bactéries. Un dispositif tout fibré devra être optimisé avec des fonctions microfluidiques adaptées aux nouvelles problématiques. Cela pourra être nécessaire pour étudier l'effet rapide d'agents sur les bactéries.

🔗 Pour étudier de nouveaux objets. Des objets tels que des virus, des levures ou des cellules pourraient également être piégés sur nos structures optiques, ouvrant une étendue quasiment infinie de nouvelles caractérisations et applications.

Communications

PUBLICATIONS

- ✎ *Monitoring bacterial response to heat stress with on-chip optical micro-resonator.* M. Tardif, E. Picard, P. R. Marcoux, V. Gaude, J.-B. Jager, E. Hadji, D. Peyrade, *Lab Chip*, Publication en soumission (2018).
- ✎ *Gram-type Differentiation of Bacteria with 2D Hollow Photonic Crystal Cavities,* R. Therisod, M. Tardif, P. R. Marcoux, E. Picard, J.-B. Jager, E. Hadji, D. Peyrade, and R. Houdré, *Appl. Phys. Lett.* **113**, 111101 (2018).
- ✎ *Optical tweezing using tunable optical lattices along a few-mode silicon waveguide,* C. Pin, J.-B. Jager, M. Tardif, E. Picard, E. Hadji, F. de Fornel, B. Cluzel, *Lab Chip* **18**, 1750-1757 (2018).
- ✎ *Single-cell bacterium identification with a SOI optical microcavity,* M. Tardif, J.-B. Jager, P. R. Marcoux, K. Uchiyamada, E. Picard, E. Hadji, D. Peyrade, *Applied Physics Letters* **109**, 133510 (2016).

CONFERENCES INTERNATIONALES ET CONGRES

- ✎ SPIE Optics+Photonics, **2018**, San Diego (**Etats-Unis**)
SPEAKER
- ✎ ICPS, **2018**, Montpellier (**France**)
SPEAKER
- ✎ OSA, **2018**, Zurich (**Suisse**)
SPEAKER
- ✎ Ecole d'été SPIE Biophotonics 2017, **2017** (**Suède**)
POSTER
- ✎ Congrès National de la SFM, **2017**, Paris (**France**)
POSTER
- ✎ GDR B2i (Bio-Ingénierie des Interfaces- Interactions bactéries/surfaces), **2017**, Paris (**France**)
SPEAKER
- ✎ Workshop Namisceb, **2016**, Grenoble (**France**)
SPEAKER
- ✎ PECS XII, **2016**, York (**Angleterre**) - News & Views, *Nature Photonics* **10**, 628-629 (2016)
SPEAKER
- ✎ META'16, **2016**, Malaga (Espagne)
SPEAKER

ENSEIGNEMENT

- 🔗 Mission de Monitorat – Label Enseignement
200 heures d'enseignement en L1 et L2 (TD, TP, encadrement de projets), UFR de Chimie-Biologie
Unités d'enseignement : Biochimie, Enzymologie et Microbiologie

ATELIERS DE VULGARISATION

- 🔗 La Recherche Fait Ecole (RFE) – (2015/2017)
Ateliers de vulgarisation sur la lumière – *Pourquoi le ciel est bleu ?*
Public : élèves de 4^{ième} de collèges de la région grenobloise
- 🔗 Valorisation de parcours scientifiques (2015/2016)
Public : Lycéens (1^{ère}, Terminale), Master NanoSciences
- 🔗 Festival Pint of Science – Oratrice (2018)
Échanges autour d'un thème scientifique - *Les Phages, prédateurs de bactéries*
Tout public

Annexe 1

Cotes nominales (structures SOI 340 nm)

Les cotes nominales des structures optiques à cristaux photoniques CMT ont été optimisées pour des structures en SOI 340 nm dans la thèse de Philippe Velha [ref 1]. Elles sont données Fig. 1.

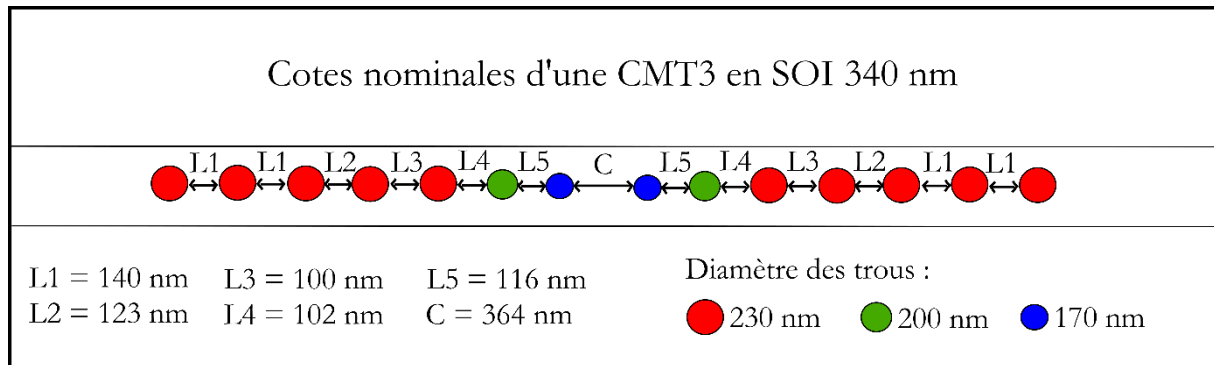


Fig. 1 – Cotes nominales d'une microcavité CMT3

Cotes optimisées (structures SOI 250 nm)

Ces cotes ont été optimisées pour des structures en SOI 250 nm. L'optimisation a été réalisée par modélisation numérique et est présentée au **Chapitre II** de ce manuscrit de thèse. Elles sont données Fig. 2.

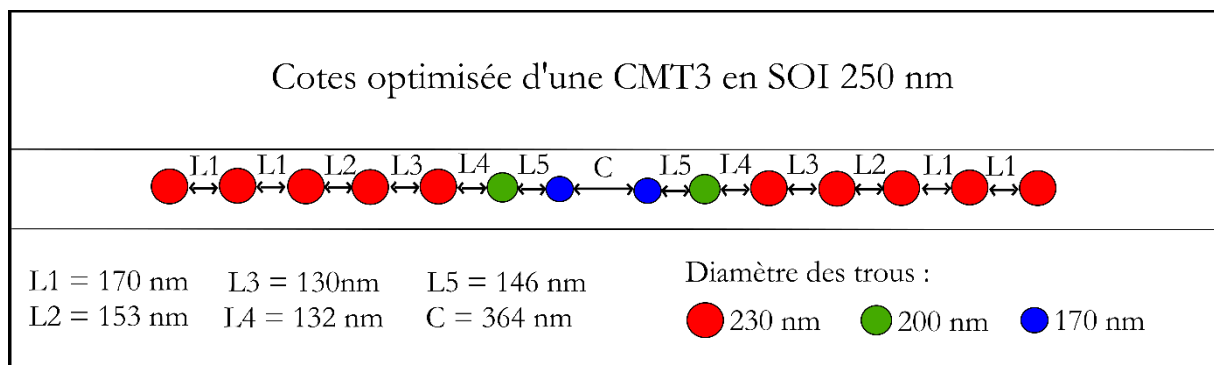


Fig. 2 – Cotes d'une microcavité CMT3 optimisées pour des structures en SOI 250 nm.

Référence :

[1] *Ingénierie de mode en optique intégrée sur silicium sur isolant*. P. Velha, Université Paris Sud - Paris XI (2008).

Annexe 2

Processus d'identification de bactéries

En l'absence d'équipements de spectroscopie de masse, plusieurs tests sont effectués afin de déterminer l'espèce bactérienne responsable d'une infection. Ce sont des tests « d'orientation » qui permettent, grâce à un cheminement à arborescence, d'identifier les bactéries. Cette arborescence est montrée **Fig. 1**. Nous allons détailler ici les différents tests d'orientation de cette arborescence :

1. Test de Gram : GRAM + / GRAM -

Le test de gram présenté dans le manuscrit au **Chapitre IV** est le premier test effectué. Il permet de déterminer la structure membranaire des bactéries grâce à un test de coloration et une étude microscope.

2. Recherche de l'oxydase : OXY + / OXY -

La recherche de l'oxydase consiste à évaluer la capacité des bactéries à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine (en leurs formes oxydées semi-quinoniques, qui est rose-violet). On s'attend donc à un changement de couleur de l'incolore au rose si les bactéries testées sont **OXY +**, sinon elles sont dites **OXY -**.

3. Recherche de la catalase : CAT + / CAT -

La catalase est une enzyme qui rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) chez les bactéries ($2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$). Le H_2O_2 peut être produit à la suite de réactions métaboliques ou lors de la respiration (bactéries en aérobie). Toutes les bactéries ne possèdent pas cette enzyme, le test de recherche de la catalase consiste à déposer des bactéries dans de l' H_2O_2 et à observer une présence (**CAT+**) ou une absence (**CAT -**) de dégagement gazeux d'oxygène.

4. Recherche du métabolisme respiratoire : O/F=F - O/F=O - O/F=Négatif

Certaines bactéries peuvent utiliser l'énergie dégagée de l'oxydation de composés chimiques comme source d'énergie chimique (bactéries chimiotrophes). Dans ce cas, deux types de métabolismes peuvent être utilisés pour dégrader un substrat : la respiration et la fermentation. Ces deux métabolismes peuvent être utilisés par une même bactérie suivant les conditions : respiration en aérobiose et fermentation en anaérobiose par exemple. On utilise le test **O/F** qui permet de tester le comportement des bactéries en présence de glucose avec et sans oxygène. La réaction en présence d'oxygène et de glucose crée un type d'acide (CO_2) s'il y a respiration et la réaction avec le glucose en absence d'oxygène crée un autre type d'acide ($C_3H_3O_3$) s'il y a fermentation. La présence de ces acides est ensuite détectée par indicateur pH (Bleu de bromothymol).

Si les deux acides sont détectés il y a respiration ou fermentation en aérobie et fermentation en anaérobie, le résultat du test est noté **O/F=F**. Si l'acidification n'a lieu qu'en aérobiose seule la respiration est possible, le résultat du test est noté **O/F=O**. Si aucune acidification n'est détectée les bactéries n'utilisent pas le glucose et le résultat du test est **O/F=Négatif**.

4. Test en lactose : Lactose +/ Lactose -

Certaines bactéries peuvent fermenter le lactose grâce à une enzyme : la β -Galactosidase. Elle hydrolyse le lactose en galactose et dextrose. Cette enzyme peut également hydrolyser l'ONPG (Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside). On teste donc l'hydrolyse de l'ONPG pour tester la production de β -Galactosidase chez les bactéries. Ce test est basé sur l'utilisation de disques imprégnés d'ONPG que l'on met au contact d'une suspension bactérienne en milieu liquide (eau distillée). Si le test est positif l'hydrolyse de l'ONPG donne une couleur jaune à l'eau distillée. Les bactéries sont alors dites **Lactose +**. Si le test est négatif elles seront **Lactose -**. Ce test nécessite une incubation à 37°C pendant 2h.

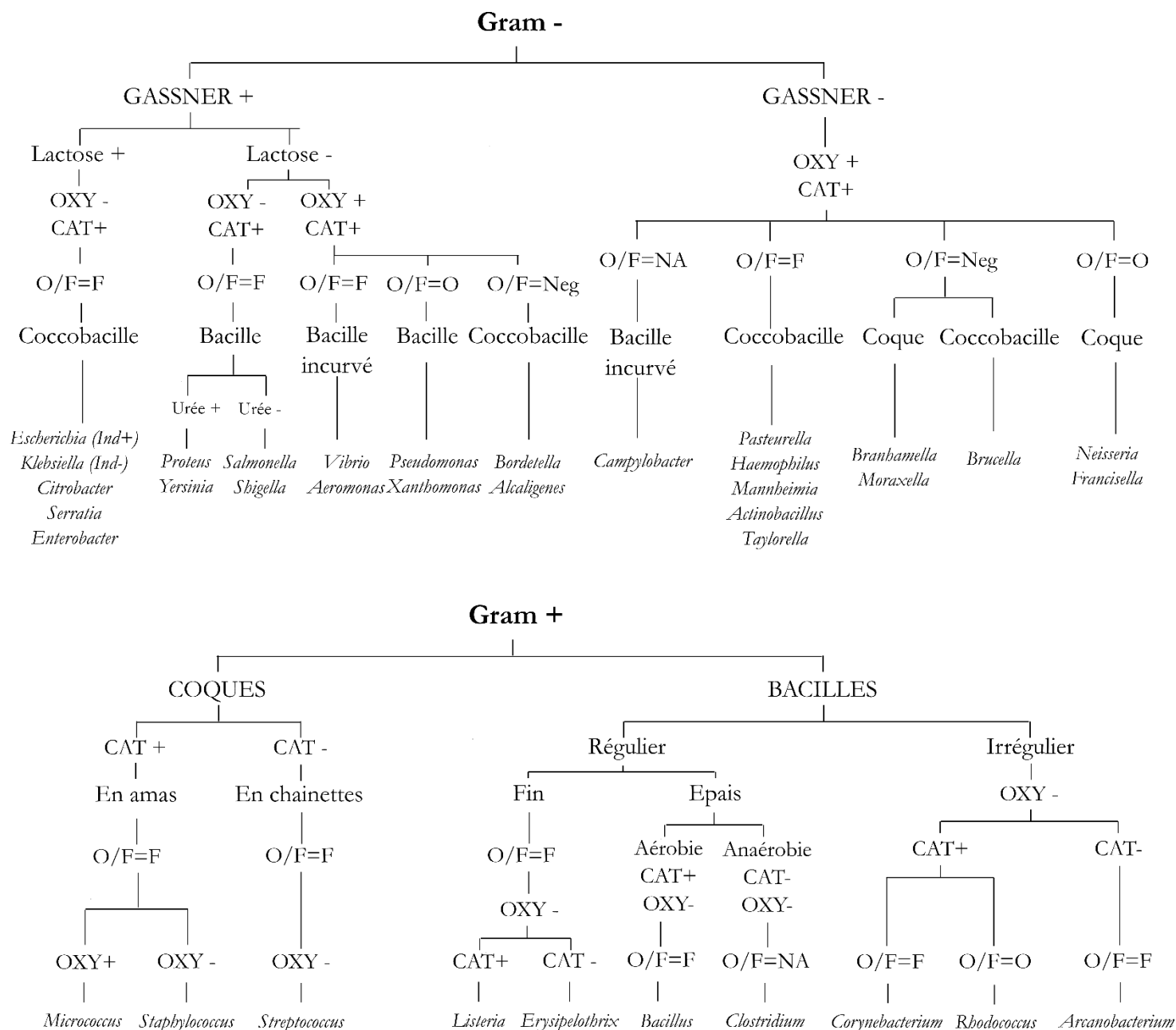
5. Recherche de l'uréase : urée +/ urée -

L'uréase est une enzyme qui peut être produite par les bactéries et qui permet de catalyser la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac ($(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$). La présence de NH_3 provoque une alcalinisation du milieu, ce qui peut faire virer un indicateur coloré contenu dans le milieu réactif urée-indole du jaune-orange vers le rouge-brun (apparition d'un anneau rouge). Ce test nécessite également une incubation à 37°C pendant au minimum 2h.

6. Test de croissance en milieu Gassner : Gassner +/ Gassner -

Certains milieux de cultures peuvent être utilisés pour sélectionner (et donc identifier) certaines bactéries. C'est le cas du milieu **Gassner** (gélose) qui contient du jaune de métachrome, ce qui permet de sélectionner des bactéries à Gram négatif de type *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* ou *Pseudomonaceae*. Ce milieu contient également du lactose et un indicateur pH coloré (Bleu à l'eau), ce qui permet de différencier les bactéries **LACTOSE +** (gélose bleue) des germes **LACTOSE -** (gélose jaune).

La liste de ces tests n'est pas exhaustive mais elle permet de comprendre le cheminement d'identification représenté **Fig. 1**. D'autres tests existent et un examen microscopique entre lame et lamelle permet d'étudier la morphologie des bactéries (forme et taille), leur assemblage potentiel (amas, chaînette), leur aspect ainsi que leur mobilité.



Annexe 3

Code pour le tracé d'histogrammes sous Scilab®

Le code permettant de tracer les fonctions histogrammes sous Scilab® est le suivant. Le résultat pour ce code est donné **Fig. 1**.

```
clf()

//Tracé signal BS V21 ROUGE
Lien_Donnees_BSV10='C:\Scilab_fichiers\BS_V21.txt'
[Donnees_BSV10] = fscanfMat(Lien_Donnees_BSV10);
subplot(321)
plot2d(Donnees_BSV10(:,1),Donnees_BSV10(:,2),style=5)
replot([0,0,50,2])
title("Bactérie B. subtilis",'fontsize',3)
xlabel("Temps (s)",'fontsize',2)
ylabel("Intensité (u.a)",'fontsize',2)

//Tracé signal Hist BS V21 ROUGE
subplot(322)
histplot(Donnees_BSV10(:,1),Donnees_BSV10(:,2),style=[5]);
replot([0,0,2,25])
title("Bactérie B. subtilis",'fontsize',3)
xlabel("Intensité du signal optique (u.a)",'fontsize',2)
ylabel("Fonction histogramme",'fontsize',2)

//Tracé signal EC V2 BLEU
Lien_Donnees_BSV13='C:\Scilab_fichiers\E.Coli_V2.txt'
[Donnees_BSV13] = fscanfMat(Lien_Donnees_BSV13);
subplot(323)
plot2d(Donnees_BSV13(:,1),Donnees_BSV13(:,2),style=[2])
replot([0,0,50,2])
title("Bactérie E. coli",'fontsize',3)
xlabel("Temps (s)",'fontsize',2)
ylabel("Intensité (u.a)",'fontsize',2)

//Tracé signal Hist EC V2 BLEU
subplot(324)
histplot(Donnees_BSV13(:,1),Donnees_BSV13(:,2),style=[2]);
replot([0,0,2,25])
title("Bactérie E. coli",'fontsize',3)
xlabel("Intensité du signal optique (u.a)",'fontsize',2)
ylabel("Fonction histogramme",'fontsize',2)

//Tracé signal SE V4 VERT
Lien_Donnees_BSV16='C:\Scilab_fichiers\SE_V4.txt'
[Donnees_BSV16] = fscanfMat(Lien_Donnees_BSV16);
subplot(325)
plot2d(Donnees_BSV16(:,1),Donnees_BSV16(:,2),style=[3])
replot([0,0,50,2])
title("Bactérie S.epidermidis",'fontsize',3)
xlabel("Temps (s)",'fontsize',2)
ylabel("Intensité (u.a)",'fontsize',2)

//Tracé signal Hist SE V4 VERT
subplot(326)
histplot(Donnees_BSV16(:,1),Donnees_BSV16(:,2),style=[3]);
replot([0,0,2,25])
title("Bactérie S.epidermidis",'fontsize',3)
xlabel("Intensité du signal optique (u.a)",'fontsize',2)
ylabel("Fonction histogramme",'fontsize',2)
```

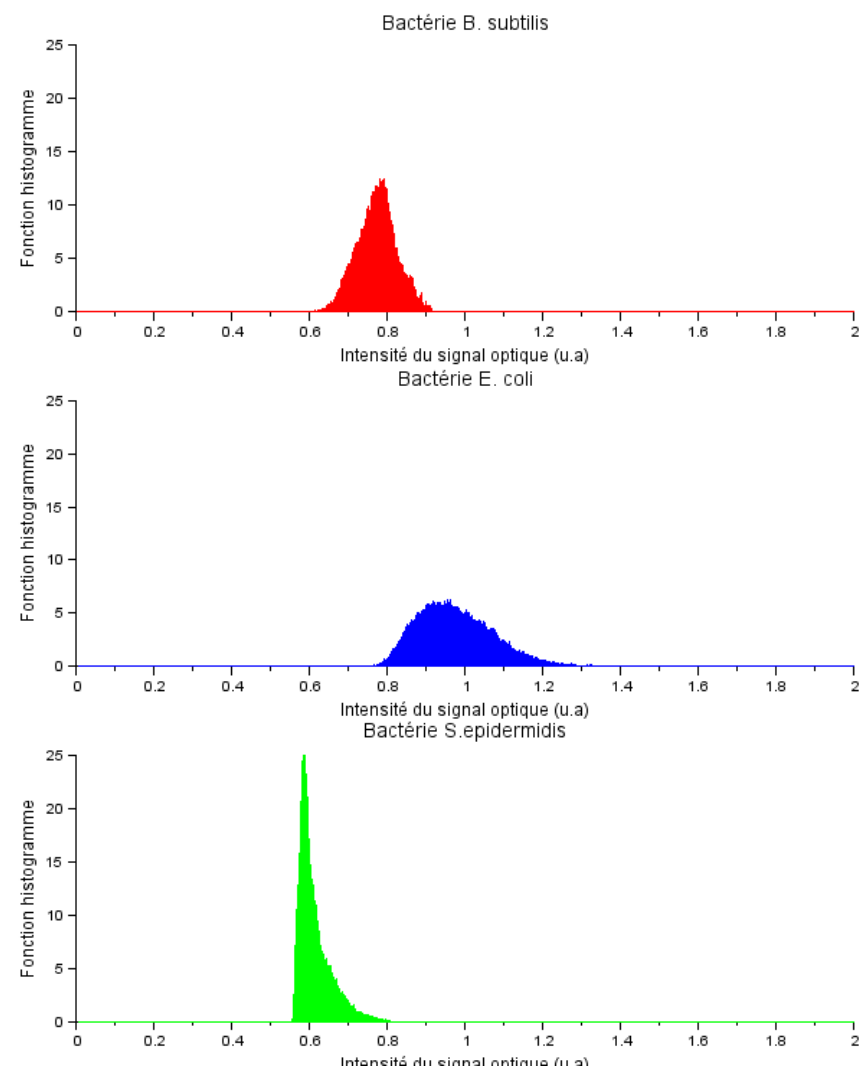
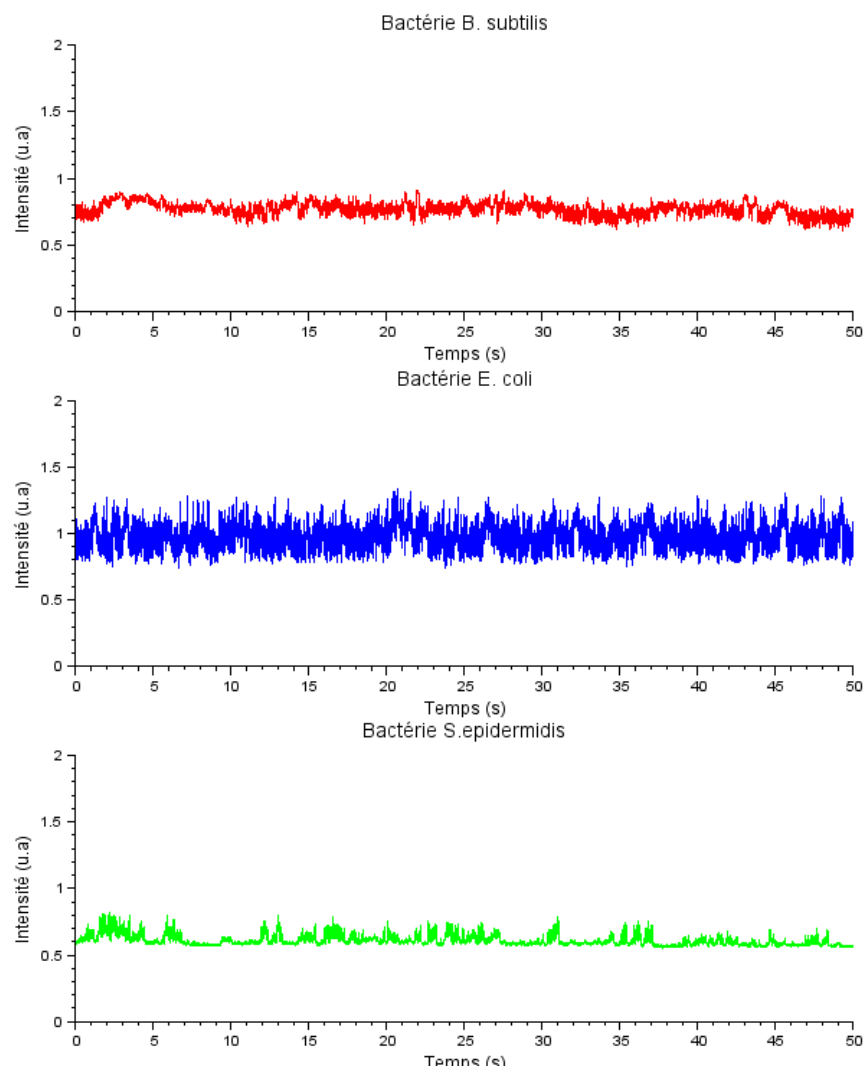


Fig. 1 – Résultat du code Scilab® pour le tracé de fonctions histogrammes.

Annexe 4

Intégration du dispositif de piégeage

Nous avons évoqué au dernier chapitre les contraintes liées au temps de manipulation expérimentale, notamment sur les étapes de préparation d'échantillon, de montage sur le porte échantillon et de couplage des structures optiques avec la fibre d'injection. De plus, l'encombrement du dispositif fait qu'il est impossible de le déplacer facilement et rapidement dans un autre laboratoire. Au cours de cette thèse, certaines problématiques ont été soulevées et le besoin de déplacer le dispositif de piégeage s'est ressenti. Nous avons notamment été sollicités pour certains projets qui nécessitaient de travailler avec des bactéries pathogènes (classe 2), ce qui est impossible dans notre laboratoire. Pour pouvoir répondre à ces sollicitations et problématiques, nous avons travaillé à l'intégration du dispositif, en travaillant notamment sur le couplage optique et le système microfluidique.

1. Couplage optique

1. a. Limites du couplage optique par la face clivée

Le couplage optique par la tranche de la lumière dans les structures photoniques que nous utilisons implique des contraintes importantes de positionnement de la fibre optique d'injection. Afin de maximiser la puissance injectée, il convient de placer avec précision la fibre et de retoucher ensuite cette position car le couplage peut évoluer. On peut en effet observer un déplacement de la fibre ou de l'échantillon dû à des variations de température, à des variations de puissance injectée ou à de légers déplacements mécaniques (platines piézoélectriques). Le temps de couplage est donc non négligeable du fait de ces éléments et peut prendre plusieurs minutes. Pour certaines applications ce temps de couplage peut constituer une contrainte. De plus, par cette méthode, les pertes sont importantes à l'injection du fait d'une importante réflexion de la lumière sur la face clivée de l'échantillon. L'utilisation des tapers d'injection permet de limiter ces pertes mais d'autres dispositifs de couplages sont plus pertinents, notamment l'utilisation de **réseaux de couplage**.

1. b. Réseaux de couplage

Les réseaux de couplage permettent de coupler la lumière à partir d'une fibre d'injection à face clivée dans des structures silicium (SOI) avec des pertes de l'ordre de 1,6 dB [ref 1-5]. La position de la fibre d'injection est moins contraignante avec ce système d'injection que pour l'injection directe présentée précédemment. En effet les dimensions du réseau de couplage sont similaires à celles de la fibre, ce qui permet de collecter un maximum de lumière injectée. Deux types de design de réseaux ont été réalisés, des réseaux droits (**Fig. 1a**) et des réseaux circulaires (**Fig. 1b**). Pour le design des réseaux droits nous nous sommes inspirés des structures des références [ref 1-3]. Le design des réseaux circulaires est issu de nos laboratoires des travaux de J. B. Jager.

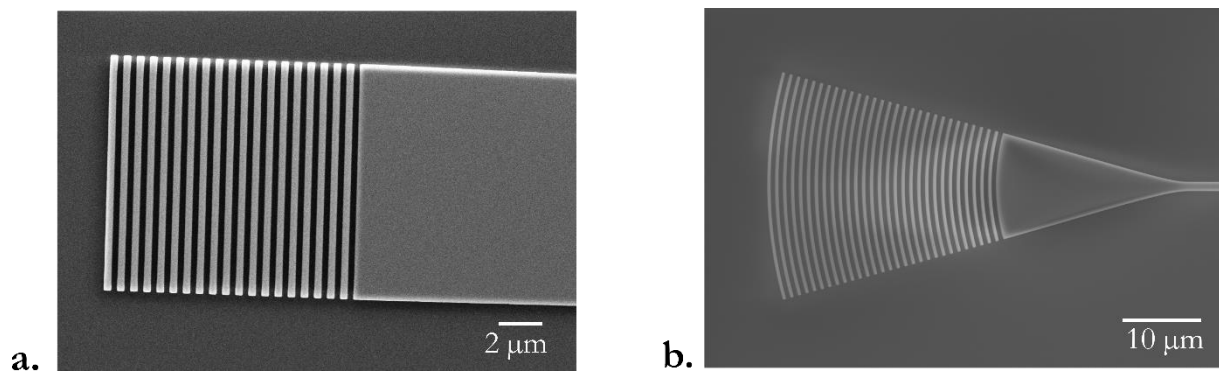


Fig. 1 – Deux design de réseaux de couplage : réseaux droits (a) et circulaires (b).

Le couplage de la lumière se fait directement par fibre optique avec un angle légèrement incliné par rapport à la normale optimal entre 12° et 24° (**Fig. 1a**). Il est possible de coller la fibre directement au réseau de couplage, ce qui nous permet d'avoir une puce optofluidique solidaire du système d'injection fibré, réduisant les contraintes du couplage (colle UV). L'indice optique de la colle UV est de 1,56, ce qui favorise le couplage par un contraste d'indice moindre que si la lumière était couplée dans l'air. La colle a été choisie suffisamment visqueuse (300 cps) pour ne pas couler sur tout l'échantillon avant réticulation UV. Elle est de plus contenue par un bassin de PDMS circulaire (**Fig. 2**).

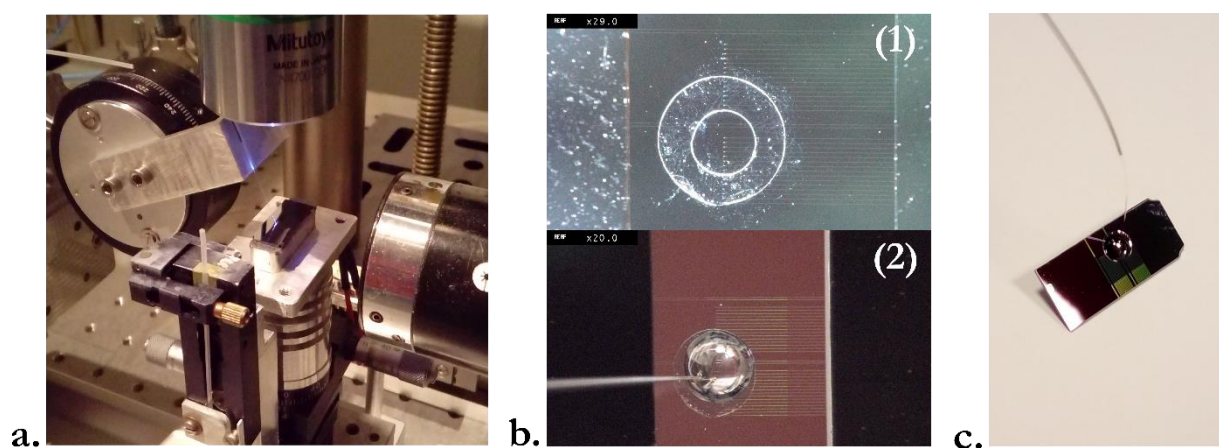


Fig. 2 – a. Couplage de la lumière par réseaux de couplage, montage développé pour le maintien de la fibre optique. b. Collage de la fibre d'injection sur un réseau. (1) Préparation de l'échantillon, sélection du réseau à coller et dépôt d'un bassin en PDMS pour retenir la colle. (2) Fin de l'étape de collage. c. Photo de l'échantillon avec la fibre d'injection collée.

Protocole

Pour le collage de la fibre nous préparons l'échantillon avec le bassin de PDMS circulaire visible **Fig. 2b-1** puis nous optimisons la position de la fibre pour le couplage en observant le signal transmis par la structure optique. Lorsque le couplage est optimisé nous déposons une goutte de colle dans le bassin. Nous réajustons la position de la fibre puis la goutte de colle est réticulée par lumière UV.

Dans notre dispositif seul le système d'injection de la lumière est fibré, il est cependant tout à fait envisageable par la suite de fibrer également la collection de la lumière en sortie de structure optique.

Ces réseaux de couplage ont été utilisés pour injecter de la lumière dans des guides d'onde puis dans des cristaux photoniques 1D. Nous avons pu montrer le piégeage de la bactérie *E. coli* sur des cavités CMT5 et CMT6 à 10 mW de puissance injectée en sortie de laser. Un exemple de résonance d'une structure CMT5 dans l'EDI couplée par réseau et de piégeage réalisé sur cette structure est montré **Fig. 3**.

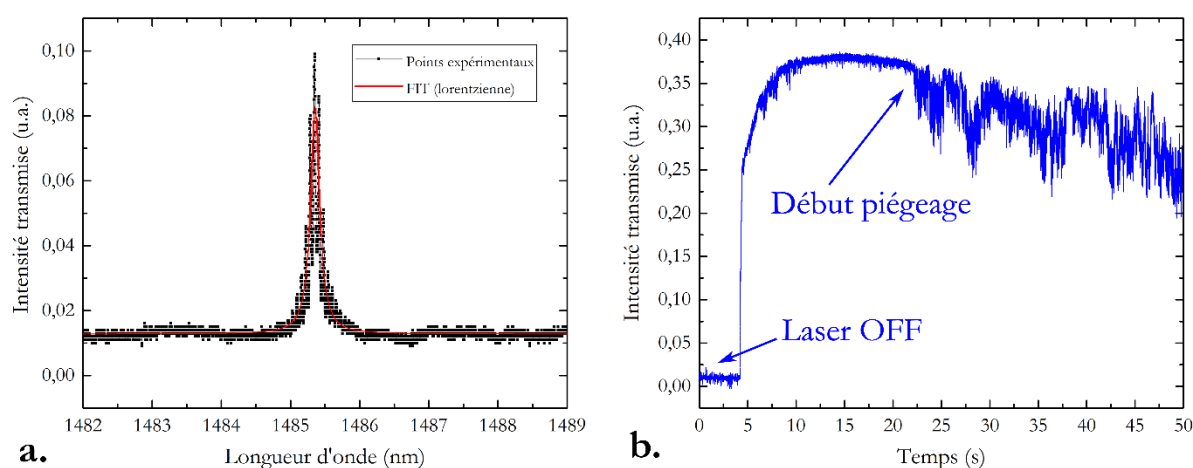


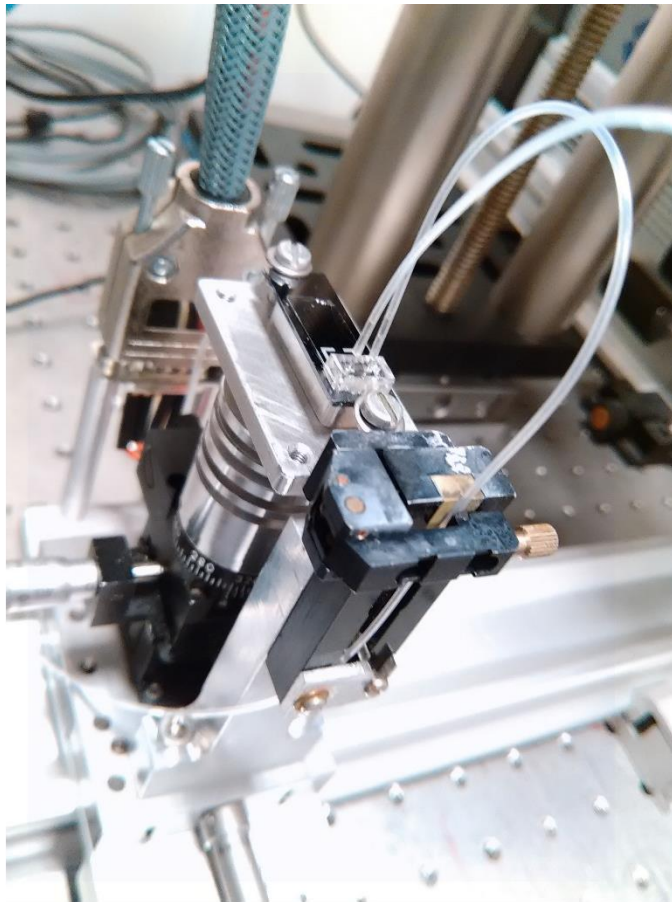
Fig. 3 – a. Résonance d'une cavité CMT5 ($Q=9500$), couplage par réseau. **b.** Signal de piégeage d'une bactérie *E. coli* sur cristal photonique à microcavité CMT5 pendant 30 secondes.

Nous montrons donc ici la faisabilité du piégeage de bactéries par cristaux photoniques 1D (CMT5) avec un couplage par réseau. L'utilisation de ces réseaux de couplage et le collage des fibres directement sur la puce optofluidique ouvrent la voie à de nombreuses applications en allégeant les contraintes expérimentales. Nous avons montré dans ce manuscrit que la méthode de caractérisation temporelle des piégeages est bien plus complète que la méthode de caractérisation spatiale. Nous pouvons donc avec ces nouvelles puces fibrées envisager un dispositif de piégeage et d'analyse beaucoup plus intégré que précédemment. Ce dispositif serait uniquement constitué des sources lasers, de la puce optofluidique fibrée et de l'équipement d'analyse CT400. Avec un tel dispositif un déplacement dans un laboratoire de microbiologie de classe 2 pourra être envisagé.

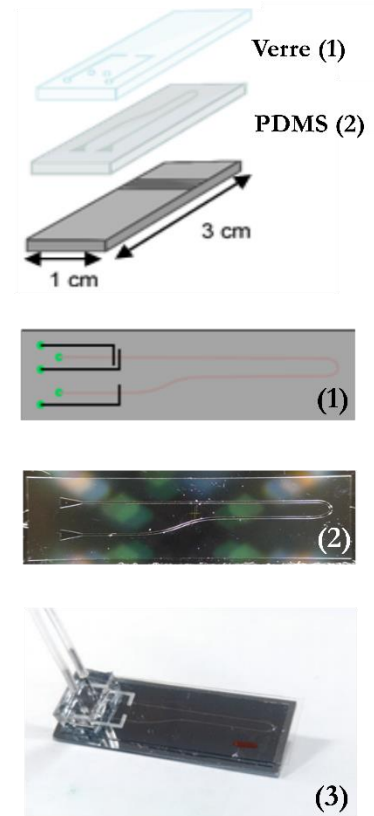
Dans ce contexte, notre système de microfluidique statique est un peu limité pour adresser des problématiques plus complexes. Nous avons donc travaillé à son développement et avons pour cela profité de l'expertise du laboratoire de Romuald Houdré de l'institut de Physique de l'EPFL avec qui nous avons collaboré.

2. Microfluidique

Nous avons développé un système de microfluidique sur le modèle de ceux développés par N. Descharmes et R. Thérissod [ref 6]. Ce système est décrit **Fig. 4**.



a.



b.

Fig. 4 – **a.** Puce optofluidique montée avec le système de fluide sur le porte-échantillon. **b.** Système de microfluidique développé permettant l'injection de fluide et l'arrêt du flux (vannes). Une lamelle de verre dans laquelle sont usinés des canaux à air comprimé est déposée sur une couche de PDMS dans laquelle se trouve un canal épais de $10\ \mu\text{m}$ et large de $200\ \mu\text{m}$. (1) Dessin des canaux gravés dans la lamelle de verre. (2) Moule en résine permettant de fabriquer les canaux dans le PDMS. La puce optofluidique complète est montrée en (3).

Protocole

Nous avons fabriqué des moules de résines pour réaliser des canaux de $200\ \mu\text{m}$ de large et de $10\ \mu\text{m}$ de haut dans une couche de PDMS de $100\ \mu\text{m}$ d'épaisseur ensuite découpée aux dimensions de notre puce photonique. Les moules (**Fig. 4b-2**) sont réalisés sur des wafers silicium par lithographie UV (Smartforce Technologie ®) et une épaisseur de PDMS de $100\ \mu\text{m}$ est déposée par Spincoating sur ces wafers par la suite puis réticulée 15 minutes à 100°C . Une lamelle de verre de $160\ \mu\text{m}$ d'épaisseur est usinée à la fraiseuse numérique pour creuser des canaux de $25\ \mu\text{m}$ de profondeur et $500\ \mu\text{m}$ de large (**Fig. 4b-1**). Des trous de diamètre $700\ \mu\text{m}$ sont également usinés comme représentés **Fig. 4b-1** pour permettre l'injection de liquide dans les canaux PDMS et d'air comprimé dans les canaux en verre. Ces canaux à air comprimé peuvent être utilisés comme des vannes : lorsqu'on y injecte l'air comprimé cela comprime les canaux de PDMS qui se bouchent, arrêtant le flux de liquide. On soumet la couche de PDMS et la lamelle de verre à un plasma oxygène puis on les scelle en ajustant la position de la lamelle de verre sur la couche de PDMS pour faire correspondre les canaux et les trous d'injection. On place ensuite l'ensemble sur les structures photoniques de la puce et l'ensemble est scellé en le plaçant à 70°C pendant 24h. On dépose ensuite un bloc de PDMS d'environ $5\ \text{mm}$ d'épaisseur qui sert de bloc d'injection (air comprimé et liquide) sur la zone d'injection (trous). Ce bloc de PDMS a préalablement été perforé sur le même motif que la plaque de verre. Un emporte-pièce en aluminium (patron) permet une position précise des trous. Des tuyaux sont ensuite connectés aux entrées et sorties de fluide et à celles d'air comprimé. Nous n'avons pas encore développé de système d'injection pour l'air comprimé mais pour l'injection de fluide nous travaillons avec un moteur pousse-seringue développé par C. Pin durant la thèse qui a précédé la mienne [ref 7].

Ce système de microfluidique dynamique ouvre de nouvelles perspectives expérimentales. Il permet de réduire le temps expérimental en autorisant le renouvellement d'échantillons de bactéries sans déplacement de la structure photonique. Il autorise également des mesures directes en températures (porte échantillon chauffant) pour lesquelles nous étions limitées par le phénomène d'évaporation dans les systèmes de fluidique statique (non-scillés). La fabrication et l'utilisation de ce nouveau dispositif microfluidique reste à optimiser suivant les applications envisagées. Des systèmes d'injection de liquide et d'air comprimé permettant de réguler précisément le flux de liquide dans l'échantillon devront notamment être développés.

Références :

- [1] *Silicon grating couplers for low loss coupling between optical fiber and silicon nanowires*. Justin C. Wirth (2011).
- [2] *The Viable but Nonculturable State in Bacteria*. James D. Oliver, *J Microbiol.* **93**, *Special Issue*, 93-100 (2005).
- [3] *High-efficiency silicon-on-insulator fiber-to-chip grating couplers using a silicon overlay*. D. Vermeulen, S. Selvaraja, P. Verheyen, G. Lepage, W. Bogaerts, and G. Roelkens, *Proc. IEEE 6th Int. Conf. Group IV Photonics, San Francisco, CA*, (2009).
- [4] *CMOS-compatible high efficiency double-etched apodized waveguide grating coupler*. Y C Li, H Zhang, M Yu, GQ Lo - *Optics express* (2013).
- [5] *Grating Couplers for Coupling between Optical Fibers and Nanophotonic Waveguides*. D. Taillaert, F. Van Laere, M. Ayre, W. Bogaerts, D. Van Thourhout, P. Bienstman and R. Baets, *Japanese Journal of Applied Physics* **45**, 8A, 6071–6077 (2006).
- [6] *Resonant optical trapping in microfluidic-integrated hollow photonic crystal cavities*. Nicolas Descharmes, *Thèse No 5904, École Polytechnique Fédérale De Lausanne*, (2013).
- [7] *Piégeage et manipulation d'objets colloïdaux à l'aide de champs optiques intégrés sur puces*. C. Pin, *Thèse de L'Université de Bourgogne* (2016).