



HAL
open science

Libération de composés intracellulaires par application d'arcs électriques entre électrodes immergées

Hadrien Lamotte

► **To cite this version:**

Hadrien Lamotte. Libération de composés intracellulaires par application d'arcs électriques entre électrodes immergées. Biotechnologies. Communauté Université Grenoble Alpes; Institut national polytechnique de Grenoble (INPG), 2017. Français. NNT: . tel-01744344v1

HAL Id: tel-01744344

<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01744344v1>

Submitted on 27 Mar 2018 (v1), last revised 23 Aug 2018 (v2)

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Mécanique des fluides, Energétique, Procédés**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Hadrien LAMOTTE

Thèse dirigée par **Jean-Luc ACHARD**
Co-encadrée par **Jean-Maxime ROUX**

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie et d'Architecture
Microfluidique** du **CEA Leti**

dans **l'École Doctorale Ingénierie - Matériaux, Mécanique,
Environnement, Energétique, Procédés, Production (I-MEP2)**

Libération de composés intracellulaires par application d'arcs électriques entre électrodes immergées

Release of intracellular compounds by spark discharges between immersed electrodes

Thèse soutenue publiquement le **11 décembre 2017**,
devant le jury composé de :

Monsieur Franz BRUCKERT

Professeur des Universités à l'INP de Grenoble (Président)

Monsieur Jack LEGRAND

Directeur de Recherche au CNRS – GEPEA Nantes (Rapporteur)

Monsieur Laurent PÉCASTAING

Professeur des Universités au SIAME – Université de Pau et des Pays
de l'Adour (Rapporteur)

Madame Magalie FAIVRE

Chargée de Recherche au CNRS – Institut des nanotechnologies de Lyon
(Examinatrice)

Monsieur Jean-Luc ACHARD

Directeur de Recherche au CNRS – LEGI Grenoble (Directeur de thèse)

Monsieur Jean-Maxime ROUX

Ingénieur chercheur au CEA Grenoble (Co-encadrant)



Remerciements

Avant d'introduire ce travail de thèse, je tiens tout d'abord à exprimer dans les lignes suivantes ma gratitude envers les différentes personnes qui m'ont permis d'obtenir le titre de docteur de l'Université Grenoble Alpes. Je commencerai par adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail avec attention et bienveillance. Mes rapporteurs : Monsieur Jack Legrand, Directeur de l'UMR CNRS 6144 (Génie des Procédés Environnementaux et Agroalimentaire), et Monsieur Laurent Pécastaing, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour et responsable de l'équipe génie électrique du Laboratoire des Sciences pour l'Ingénieur Appliquées à la Mécanique et au génie Electrique (SIAME). C'est avec beaucoup de considération et d'admiration que je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour vos rapports détaillés et vos questions pertinentes le jour de ma soutenance. Je ne saurai attendre davantage avant de remercier également Monsieur Franz Bruckert, Professeur des Universités à l'Institut National Polytechnique de Grenoble et directeur du Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP), qui a accepté de présider mon jury de thèse, et Madame Magalie Faivre, Chargée de Recherche à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon, pour l'intérêt manifeste qu'elle a porté à l'examen de mon travail de thèse. D'une manière générale j'aimerais insister sur l'intérêt porté à mon travail par chacun des membres du jury et sur leur bienveillance lors de la soutenance ; de ces deux ingrédients m'est apparu un véritable plaisir à discuter lors des questions, plaisir dont je n'aurais jamais imaginé l'existence quelques jours plus tôt... Je vous en remercie sincèrement.

Puisqu'ils ont également intégré mon jury, je continuerai mes remerciements en citant Monsieur Jean-Luc Achard, Directeur de Recherche au Laboratoire des Écoulements Géophysiques et Industriels (LEGI – UMR CNRS 5519), et Monsieur Jean-Maxime Roux, Ingénieur-chercheur au Laboratoire de Biologie et d'Architecture Microfluidique du CEA-Leti. Au-delà des raisons abordées précédemment - qui sont plus que valables pour vous deux - je suis heureux de vous avoir eu respectivement en la qualité de directeur de thèse et de co-encadrant. Jamais en manque d'idées, Jean-Maxime j'admire ton positivisme et ta capacité à trouver des solutions et des pistes à explorer, même dans les périodes où « rien ne marche ! ». Je commence aujourd'hui à me rendre compte de l'étendue des techniques expérimentales que tu m'as permis d'explorer et qui, je l'espère, me permettront d'aborder avec plus d'aisance mes travaux futurs. Tes qualités humaines s'ajoutant à cela (ou ceci ? mince...), je me réjouis d'avoir eu un encadrant arrangeant, disponible (malgré un emploi du temps plutôt chargé !), toujours de bonne humeur et passionné par ses recherches. Jean-Luc, outre ton impressionnante expertise scientifique (dont je ne suis malheureusement pas capable de mesurer l'étendue !), ta disponibilité et ta bonne humeur, ta passion pour l'encadrement d'étudiants est manifeste et je suis ravi d'avoir pu en profiter. J'ai apprécié nos innombrables réunions tous les trois au fil desquelles mes travaux et moi-même avons beaucoup évolué, je crois. Vous m'avez de plus toujours épaulé dans les moments difficiles et je vous en suis véritablement reconnaissant... J'alimenterai davantage ce paragraphe lors de nos réunions futures que j'espère voir durer !

Cette thèse n'aurait pas existé sans l'intervention de Guillaume Delapierre qui a accepté de m'accueillir dans son Laboratoire de Biologie et d'Architecture Microfluidique. Je remercie également Fabrice Navarro qui a pris sa succession pour diriger le laboratoire, tout en maintenant les fameuses « journées hors-mur » permettant aux thésards de présenter leurs travaux lors de journées atypiques. Je tiens également à remercier Nathalie pour son aptitude à résoudre efficacement et rapidement tout type de problème administratif.

Mes différents bancs expérimentaux n'auraient pas vu le jour sans l'équipe « packaging ». Je remercie Béatrice Icard pour sa bonne humeur et pour m'avoir permis de travailler avec cette équipe dirigée par Nicolas Verplanck. J'ai eu le plaisir de fabriquer mes dispositifs avec l'aide de François, Manu et Charly. Vous m'avez tous les trois transmis une partie de vos savoir-faire en CAO/FAO et pour travailler

différents matériaux avec précision. En dehors du CEA, vos conseils me servent régulièrement dans ma vie personnelle et je vous en remercie !

Malgré les nombreuses difficultés auxquelles nous avons dû faire face pour obtenir des résultats reproductibles en bactériologie, Dorothee, Myriam, Anne-Gaëlle et Patricia se sont toujours montrées optimistes et enthousiastes pour m'apporter l'aide dont j'avais besoin. Je tiens à les en remercier. Je joins à ces remerciements Mélanie, Jérôme, Tamara et Perrine qui ont réalisé une part importante des manipulations nécessaires à mon étude avec des bactéries, et avec qui j'ai pu discuter longuement des résultats autour d'un café, à la cantine, ou au Carré le jeudi soir....

Les remerciements suivants iront à l'équipe dirigée par Eric Maréchal au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale. Je tiens en particulier à exprimer ma gratitude envers Mélissa, Christelle et Josselin pour m'avoir appris la culture de microalgues et accepté de réaliser le repiquage de souches pour mes manipulations. Grâce à votre implication dans mes travaux et nos nombreuses discussions, vous m'avez ouvert un nouvel horizon, celui des microalgues, dont j'ignorais tout lors de mon arrivée au CEA. Je vous en remercie.

Je tiens également à remercier Anne-Claude et Marie pour leur implication dans mes travaux et pour l'intérêt qu'elles y ont porté, en particulier lorsque j'abordais un aspect de la chimie ! J'ajoute Cédric et Remco qui, avec le même enthousiasme, m'ont apporté leur aide respectivement pour observer les phénomènes de claquage diélectrique et pour mesurer des valeurs de tensions superficielles.

Nous n'avons toujours pas retrouvé qui a été à l'origine de l'attribution des bureaux aux thésards, mais je tiens à adresser à cette personne de vifs remerciements pour m'avoir placé à côté de Céline. Ces trois années ont été marquées par nos rires quotidiens, nos discussions riches (et moins riches) et ta précieuse aide aussi bien sur les sujets professionnels que personnels. Grâce à la présence de Giacomo nous avons pu former un trinôme de qualité, performant à toutes épreuves, en particulier celles de fin de journée... J'ai sincèrement beaucoup d'admiration pour vous et j'espère que notre amitié durera ! Je tiens également à remercier Roxane qui par sa gentillesse, sa sérénité et sa joie de vivre contagieuse a rendu plaisant de nombreux moments !

Plus généralement, je continuerai par des remerciements collectifs pour notre grand groupe fidèle aux déjeuners et aux sorties, toujours prêt à aider, et qui a fait vivre une ambiance chaleureuse au laboratoire : Vivian (Dude d'Ardèche), Antoine, David R., Claire, Guillaume, Maxime H., David G., Lisa, Charlotte, Eloïse, Maxime P., Thomas Ch., Thibaut, Florian, Lucile, Emilie P., Virginie, Fabien, Morgane, Thomas Co., Pierre-Yves, Emilie B. et Stéphanie.

Je n'oublierai pas mes colocataires et amis d'école Taia, Marvin, Florian, Yann et Kévin. Notre grande maison m'a permis d'avoir un toit au-dessus la tête pendant ces années de thèse, de partager des discussions passionnantes et de créer des souvenirs que je ne suis pas près d'oublier !

Je finirai ces pages par ma famille. Ma tante Sylvie pour ses précieux conseils et mon cousin Sébastien pour son soutien (physique !). Mes grand-parents (André, Timémé, Mimie et Nicole) qui m'ont soutenu et offert des lieux paisibles pour rédiger. Petite pensée pour mes « cousains » Mathias, Aurélie et Céline qui, en plus de tout ce qu'ils m'apportent déjà au quotidien, sont venus organiser et écouter la « soutenance surprise » ! Mes deux petites sœurs Laetitia et Clara, qui finalement ne sont plus si petites et qui m'ont aiguillé de nombreuses fois au cours de cette thèse. Mention spéciale pour Clara qui a fait la relecture intégrale finale, trouvé des erreurs et proposé des corrections, en l'espace d'une (grosse) matinée – deadline oblige. Je tiens enfin à exprimer ma gratitude envers mes parents qui se sont montrés extraordinaires lors de l'achèvement de cette thèse. Comme toujours avec calme, humour et sérénité, vous m'avez assisté techniquement dans toutes les dernières étapes (relectures, résolution de tout type de problèmes, préparation de l'apéritif...). J'admire l'efficacité dont vous faites preuve dans ces moments-là et espère pouvoir vous égaler un jour !

Table des matières

Introduction	11
Chapitre 1	15
1. La membrane cellulaire	17
1.1. Description	17
1.2. Ouverture de la membrane.....	17
2. Valorisation des constituants de microalgues.....	18
2.1. Contexte	18
2.2. Produits potentiels	19
2.3. Deux approches	20
3. Analyse des constituants de bactéries	21
3.1. Différents types d'analyses	21
3.2. Développement de systèmes d'analyse d'échantillons bruts	22
4. Différentes techniques de lyse.....	22
4.1. Méthodes chimiques.....	22
4.2. Lyse mécanique	24
4.3. Lyse thermique	25
4.4. Lyse électrique.....	25
5. Une technique innovante fondée sur des décharges haute tension	26
5.1. Similitudes avec la lithotripsie.....	26
5.2. Une décharge électrique aux effets multiples.....	26
5.3. ... à une échelle millifluidique.....	26
Chapitre 2	27
1. Mécanismes de formation d'arcs électriques entre deux électrodes immergées.....	29
1.1. Etat de l'art.....	29
1.2. Choix d'une configuration	31
2. Matériels et méthodes	32
2.1. Fabrication de la « cuve infinie ».....	32
2.2. Conception et fabrication de la « cuve en U »	33
2.3. Générateur de haute tension	33
2.4. Générateur d'impulsion et oscilloscope numérique	34
2.5. Acquisition vidéo ultra-rapide	35
2.6. Capteur de pression	35
2.7. Vue d'ensemble du banc d'étude.....	35
3. Phénoménologie de la décharge électrique : formation d'un arc	36
3.1. Formation d'un arc électrique.....	37
3.2. Etude du comportement électrique entre les électrodes.....	37
4. Comportement hydraulique en milieu non confiné.....	41
4.1. Formation et effondrement (collapse) d'une bulle.....	41
4.2. Rebonds de la bulle	42

4.3.	Evolution des paramètres de la bulle.....	42
4.4.	Observation des ondes dans la cuve	44
4.5.	Aperçu sur la modélisation des phénomènes électrohydrodynamiques entres les électrodes.....	45
5.	Comportement hydraulique en milieu confiné.....	50
5.1.	Modification de la « cuve infinie »	50
5.2.	Etude dans la cuve en U	53
	Conclusion	56
	Annexe 1 : Quelques limites du modèle isentropique	57
Chapitre 3		63
1.	Bilan des différents postes de dépense de l'énergie du générateur électrique	65
2.	Champ électrique	66
2.1.	Simulation du champ électrique produit	66
2.2.	Analyse de la cartographie	66
2.3.	Conclusion	67
3.	Rayonnement et production de radicaux libres et d'espèces oxydantes	67
3.1.	Etude du rayonnement lumineux.....	67
3.2.	Analyse chimique	69
4.	Effets mécaniques	72
4.1.	Effet du confinement sur le collapse.....	72
4.2.	Cisaillement	73
4.3.	Ondes de pression	74
5.	Echauffement	76
5.1.	Mesures.....	76
5.2.	Conclusion	77
6.	Stratégie mise en place pour la suite de l'étude	77
6.1.	Mécanismes écartés pour la lyse	77
6.2.	Mécanismes retenus pour la lyse.....	78
Chapitre 4		79
1.	Matériels et méthodes	81
1.1.	Amélioration de la cuve en U	81
1.2.	Préparation des cultures de microalgues.....	81
1.3.	Protocoles pour la préparation et la lyse des échantillons de microalgues.....	84
1.4.	Ouverture des microalgues à l'aide du diméthylsulfoxyde.....	85
1.5.	Protocoles d'analyse des échantillons	86
2.	Validation des protocoles.....	88
2.1.	Validation des méthodes de caractérisation optique	89
2.2.	Vérification des relations entre les concentrations d'intérêt et les mesures optiques	95
2.3.	Rendements d'extraction après traitement par des décharges haute tension : validation de la méthode	96
2.4.	Observation au microscope des échantillons.....	97

3.	Résultats	98
3.1.	Impact du nombre de décharges sur le rendement de lyse	98
3.2.	Effet de la concentration des microalgues	99
3.3.	Effets de la hauteur de solution	100
3.4.	Effets du chauffage et des oxydants produits au cours du traitement par décharges ...	101
4.	Discussions	103
4.1.	Démarrage d'une activité de traitement des microalgues.....	103
4.2.	Des résultats en faveur d'une lyse par effets mécaniques	103
4.3.	Récupération des composés d'intérêt	104
Chapitre 5		105
1.	Matériels et méthodes	107
1.1.	Fabrication des cuves	107
1.2.	Préparation des cultures de bactéries	107
1.3.	Traitement des échantillons.....	108
1.4.	Analyse des bactéries traitées.....	108
1.5.	Analyse de l'ADN en solution	110
2.	Résultats	112
2.1.	Preuve de concept.....	112
2.2.	Comparaison entre plusieurs techniques d'extraction de l'ADN	116
2.3.	Caractérisation du traitement par décharges haute tension pour libérer l'ADN par comparaison avec l'instrument Précellys 24.....	117
2.4.	Caractérisation des pertes d'ADN au cours du traitement par décharges	120
2.5.	Impact de l'écart entre les pointes des électrodes et ajout de BSA	122
3.	Discussions	124
Chapitre 6		127
1.	Conception d'un système de pompage pour la bioproduction.....	129
1.1.	La vanne capillaire	129
1.2.	Conception et fabrication d'une cuve	134
1.3.	Résultats et discussions.....	135
1.4.	Vieillessement de la cuve	137
2.	Etude d'un système d'analyse in situ par amplification isotherme	139
2.1.	Etude thermique	139
2.2.	Faisabilité d'une détection <i>in situ</i>	142
Conclusion		144
Conclusion générale		147
Annexe 1 : Liste des contributions scientifiques		151
Annexe 2 : Schéma électrique complet du générateur haute tension		153
Bibliographie.....		155

Introduction

De la production industrielle de biomolécules à l'analyse unicellulaire en laboratoire, l'accès au contenu intra-cellulaire est souvent indispensable lorsque des organismes vivants sont manipulés. Pour cause, la cellule, unité de base du vivant, renferme un nombre important de molécules en tout genre : matériel génétique (ADN, ARN), protéines (messenger, enzyme, anticorps...), lipides (acides gras, triglycérides...), glucides (glucose, amidon...) ou encore des pigments (chlorophylle, carotène...) dans certaines cellules végétales. Afin d'accéder aux constituants de la cellule, il peut être nécessaire de détruire la membrane qui l'entoure ; on parle alors de lyse cellulaire ou lyse membranaire. Concernant cette opération, nous nous intéresserons dans cette étude à deux domaines applicatifs majeurs :

Dans le cadre d'analyse cellulaire : la lyse constitue une étape clé dans toute analyse du contenu cytoplasmique. En laboratoire elle permet de manière non exhaustive l'étude de l'ADN, des protéines ou encore de la chlorophylle. Les exemples d'applications sont nombreux : détection de pathogènes dans un échantillon (après collecte et concentration des microorganismes), détermination de l'activité d'une enzyme, recherche d'un gène dans l'ADN... A l'heure de la miniaturisation et du développement des laboratoires sur puces, certaines techniques restent cependant trop lourdes à intégrer ; il est donc intéressant de continuer à chercher des solutions innovantes.

Dans le cadre de la bioproduction : une étape de lyse est nécessaire dans certains procédés industriels. C'est notamment le cas pour la valorisation du contenu d'algues marines. Les lipides produits par ces dernières servent aujourd'hui à la production de molécules à haute valeur ajoutée dans les domaines du cosmétique, de la pharmacologie ; des marchés de moindre valeur sont également en cours de développement : alimentation animale ou humaine, ou encore la chimie dite verte (bioplastiques) (Figure 1). La commercialisation de produits à valeur ajoutée nettement plus faible comme les bio-carburants constitue un marché encore très éloigné. Il reste que pour pouvoir envisager une production de masse de produits aujourd'hui trop coûteux pour être compétitifs, il est nécessaire d'optimiser toutes les étapes de production, notamment l'étape de lyse.

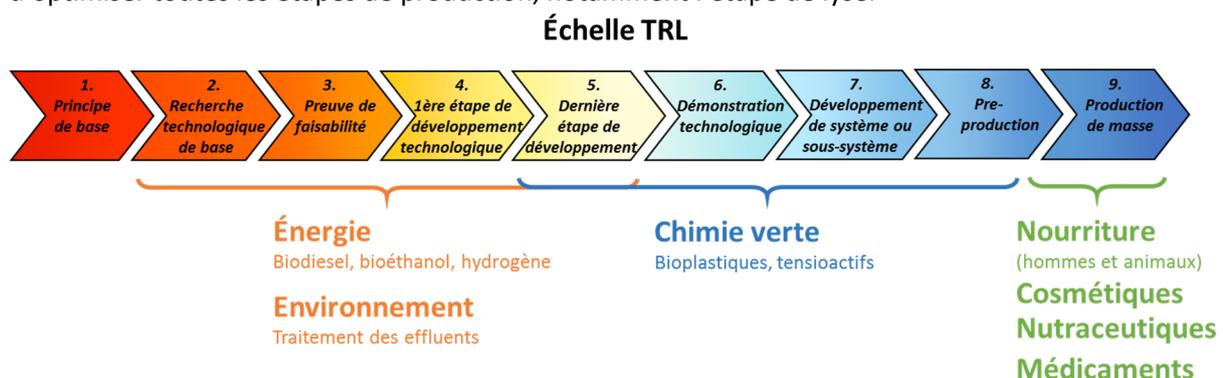


Figure 1 : Echelle de développement technologique associée à différents marchés issus des microalgues

Les procédés de lyse connaissent bien entendu d'autres domaines applicatifs comme par exemple la désinfection des eaux usées (Dang, 2011), l'extraction de composés d'intérêt pour l'industrie alimentaire (Bazhal et col., 2001; Boussetta, 2010) ou encore des traitements amaigrissants (Haute Autorité de Sûreté, 2011). Même si ce genre d'applications nous intéresse moins que les précédentes au cours de cette thèse, il permet de rendre compte de manière plus complète de l'étendu du sujet étudié.

Introduction

Par conséquent, la lyse est un thème qui a par le passé déjà suscité beaucoup d'attention, et de nombreuses techniques de lyse sont aujourd'hui fonctionnelles et développées à grande échelle. Le travail de thèse présenté dans ce mémoire est une tentative de développer une technique de lyse cellulaire fondée sur des décharges haute tension en milieu aqueux. Cette technique innovante est développée dans un dispositif de dimensions microfluidiques ; elle vise à apporter une solution économique, facile à intégrer et efficace.

Ce mémoire de thèse commencera par un chapitre introductif présentant les différentes techniques d'ores et déjà utilisées afin de la replacer dans son contexte. Ce chapitre s'achèvera sur une présentation plus précise de la technique étudiée qui s'appuiera sur une comparaison des principes physico-chimiques mis en jeu.

Le chapitre suivant se focalisera sur les mécanismes physiques fondamentaux en jeu lors de la formation de la décharge électrique avec ses conséquences sur les champs hydrauliques. Le chapitre 3 permettra de lister les différents phénomènes engendrés par une séquence d'impulsions haute tension pouvant conduire à la lyse cellulaire. L'examen des conséquences biologiques de la lyse et l'identification des mécanismes à l'origine de ces conséquences feront l'objet des chapitres suivants. Dans cette perspective, le chapitre 4 sera centré sur l'ouverture de microalgues et la lyse de bactéries sera présentée dans le chapitre 5. Enfin pour terminer cette étude, le dernier chapitre présentera des axes d'études qui permettraient de développer un système industriel fondé sur cette technique de lyse.

Chapitre 1

Lyse de membranes cellulaires

Pourquoi porter aujourd'hui autant d'intérêt à la lyse de microorganismes tels que des bactéries ou des microalgues ?

Après avoir tenté de répondre à cette question, ce premier chapitre décrira de manière succincte les différentes techniques de lyse fréquemment retrouvées dans la littérature. Cet état de l'art actuel nous permettra de mettre en évidence l'originalité des travaux menés au cours de cette thèse.

1. La membrane cellulaire

1.1. Description

Depuis l'émergence de la *théorie cellulaire* dans le courant du XIX^{ème}, la cellule est considérée par les biologistes comme l'unité de base de tout être vivant (Serres & Farouki, 1997). En dépit de leurs formes et de leurs fonctions très diverses, les cellules possèdent des caractéristiques structurales communes : elles sont entourées d'une membrane dite plasmique délimitant un espace appelé cytoplasme principalement composé d'eau et contenant de nombreux éléments. Quelques exemples de composés intra-cellulaires peuvent être donnés : il s'agit de protéines, d'acides nucléiques (associés au code génétique), de lipides, de chlorophylle. Ces éléments peuvent se trouver en solution dans le cytosol ou bien être contenus dans un espace délimité également par une membrane, voire dans la membrane cellulaire elle-même pour les protéines et les lipides (cf. Figure 2).

Au cours de son cycle de vie la cellule échange des molécules avec le milieu extérieur. Selon la nature et la fonction de la cellule la membrane cytoplasmique, composée principalement de protéines et de lipides (cf. Figure 2), est organisée de façon à favoriser spécifiquement le passage de certaines molécules (Chiantia et col., 2009). Cependant pour différentes raisons détaillées dans la suite de ce chapitre, il peut être utile de dégrader cette membrane : soit de manière réversible (dans ce cas la cellule reste viable), soit de manière irréversible en détruisant sa structure (entraînant ainsi la mort de la cellule). Le terme de « lyse cellulaire » est employé pour désigner ce dernier cas (Nan et col., 2014).

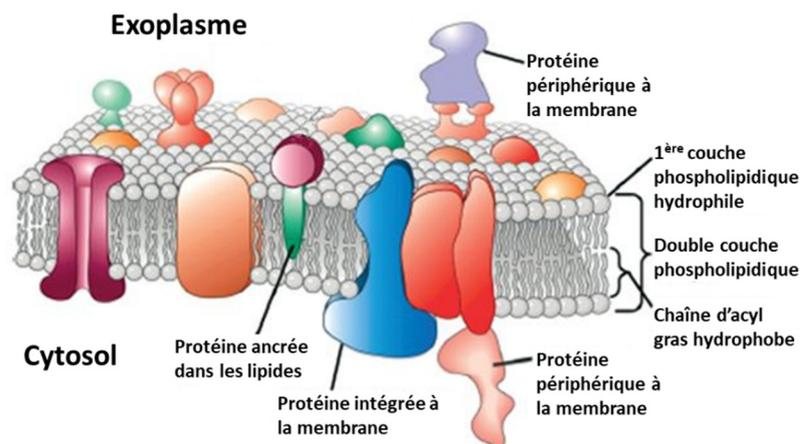


Figure 2 : Modèle d'une membrane cytoplasmique (à partir de Lodish et col., 2008).

1.2. Ouverture de la membrane

La dégradation partielle ou totale de la membrane peut être recherchée pour deux objectifs :

- Accéder au contenu intracellulaire
- Entraîner la mort de la cellule

Dans le cadre de la désinfection, le but de la lyse est de détruire des microorganismes, généralement des bactéries, afin de purifier une solution par exemple. De nombreux travaux ont été menés pour parvenir à cette fin (Grahl & Märkl, 1996; Gupta & Bluhm, 2008; Muhammad Arif et col., 2001), mais l'objectif de ce travail de thèse est autre.

Accéder au contenu intracellulaire désigne en fait deux actions distinctes : insérer une ou des molécules dans la cellule ou bien extraire le contenu cellulaire vers le milieu extérieur. Dans le premier cas le matériel introduit dans la cellule peut être des protéines ou du matériel génétique tel qu'un

plasmide ou de l'ARN. La cellule doit alors être maintenue vivante afin d'observer son comportement après introduction du matériel. La technique principalement utilisée pour introduire du matériel est l'électroporation (cf. paragraphe 4.4).

Enfin l'extraction du contenu intracellulaire, qui est l'objet d'étude de cette thèse, est nécessaire dans deux domaines : la bioproduction et l'analyse. Dans le cadre de la bioproduction, l'objectif est d'extraire le contenu cellulaire pour le valoriser. Il peut s'agir par exemple d'améliorer l'extraction de jus dans les fruits pour l'industrie alimentaire (Vorobiev & Lebovka, 2011) ou encore d'extraire le contenu de certaines microalgues. Dans le cadre de l'analyse du contenu, le but est d'identifier par exemple des protéines ou une séquence génétique spécifique pour détecter des agents pathogènes (contenu dans l'air par exemple), pour comprendre le fonctionnement d'une cellule ou encore pour diagnostiquer une maladie.

Dans la suite de ce chapitre, l'exemple de la valorisation des constituants de certaines microalgues est abordée avec une attention particulière portée au coût énergétique de la production. Le concept d'analyse de bactéries sera ensuite détaillé, en s'attachant au développement de systèmes d'analyse complets automatisés.

2. Valorisation des constituants de microalgues

2.1. Contexte

L'accroissement de la population mondiale et son industrialisation augmentent la consommation d'énergie primaire, alors que les sources finies d'énergie telles que les carburants d'origine fossile s'épuisent et contribuent au réchauffement climatique. Dans ce contexte, les microalgues, qui de toutes les espèces végétales ont le plus haut rendement de photosynthèse pour convertir l'énergie solaire et le dioxyde de carbone en dioxygène et en biomasse, ont suscité un grand intérêt en tant que source d'énergie alternative (Milano et col., 2016). Les microalgues présentent également l'avantage de pouvoir croître dans de nombreux types d'eaux, de l'eau douce à l'eau de mer mais aussi dans les eaux usées à partir desquelles elles peuvent convertir les nitrates, les phosphates et les sulfates. La culture de microalgues a ainsi un impact limité sur l'environnement comparée aux sources terrestres de biomasses développées pour la production de biocarburants (Hannon et col., 2010).

Aujourd'hui, l'enthousiasme initial pour cette source écologique d'énergie semble cependant s'être atténué. Malgré le potentiel des microalgues en tant qu'alternative aux énergies fossiles, de grands groupes comme Shell et ExxonMobil semblent abandonner leurs investissements dans ce domaine. Pour causes, les cultures de microalgues se sont avérées être très chères et des contaminations peuvent les dévaster (Ridley, 2016). Celles-ci ne sont donc pas compétitives avec la production de pétrole dont les prix n'augmentent pas significativement (Hannon et col., 2010). Les développements récents dans l'industrie des microalgues ne concernent encore que les produits à haute valeur ajoutée. La viabilité commerciale de l'industrie des biocarburants algaux n'est à l'heure actuelle pas évidente.

Parler de microalgues dans l'unique but de produire des biocarburants ne paraît aujourd'hui pas plausible (Williams & Laurens, 2010 ; Zhu, 2015). Les algues peuvent être comparées à des usines microscopiques produisant toutes sortes de composés utiles, et non uniquement des lipides dédiés à l'industries des biocarburants (Ridley, 2016). Les algues contiennent certes différents lipides (7-23%), mais également des carbohydrates (5-23%) et des protéines (6-52%) (Zhu, 2015a). Une façon d'améliorer la compétitivité industrielle des microalgues est donc de viser une optimisation complète de chaque composé qu'elles contiennent, avec des produits dont la valeur ajoutée est la plus forte possible (Vanthoor-Koopmans et col., 2013). Un tel concept au cours duquel la biomasse est convertie

en de multiples produits finaux est appelé bioraffinerie (cf. Figure 3). Il dérive des raffineries pétrolières qui produisent des carburants mais aussi de nombreuses molécules pour l'industrie chimique (Markou & Nerantzis, 2013). De telles raffineries rassemblent dans une seule installation la production de multiples produits par plusieurs étapes arrangées en une chaîne utilisant toute la matière première et réduisant les pertes. Mais une attention particulière doit être apportée à chaque étape pour ne pas détériorer l'un ou plusieurs des produits.

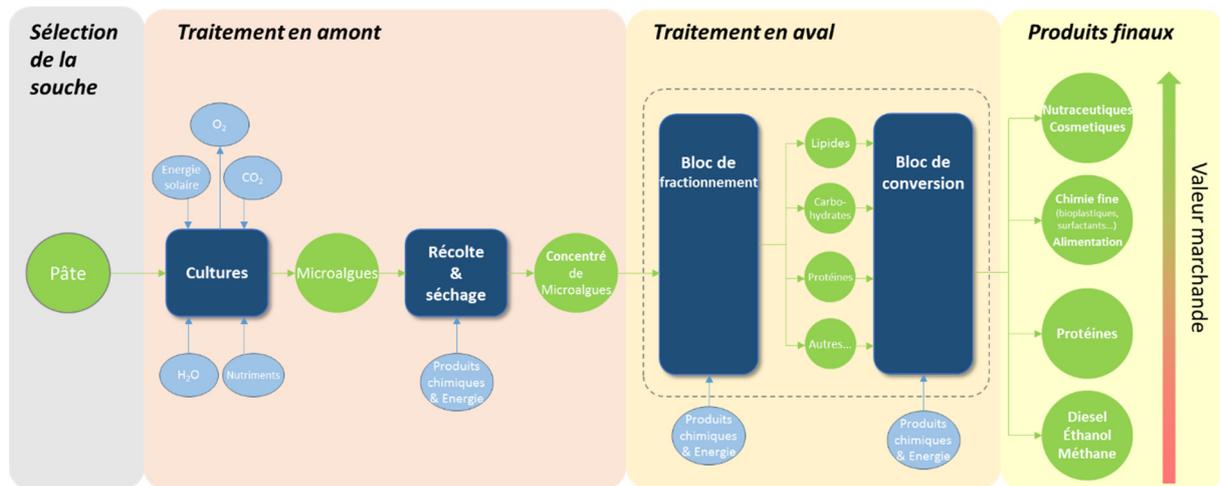


Figure 3 : Représentation du concept de bioraffinerie appliqué à la valorisation des microalgues.

En outre, plusieurs étapes doivent être améliorées pour réduire le coût global du procédé. Les espèces sélectionnées doivent être compatibles avec une culture à grande échelle (Rashid et col., 2014; Rawat et col., 2013), mais elles doivent avant tout croître rapidement et produire une quantité importante de lipides de grande qualité (Bahadar & Bilal Khan, 2013; Rashid et col., 2014). La culture représente donc une étape majeure et critique ; dans ce contexte, notons que la possibilité d'utiliser des eaux usées (municipales, industrielles, agricoles) pour la culture de microalgues réduira les coûts (Delrue et col., 2016; Zhang et col., 2016). Cette approche permet d'obtenir un substrat d'accès facile, de réduire considérablement la consommation d'eau potable, de profiter de nombreux nutriments, et de partager la gestion et les coûts des déchets (Zhu, 2015 b). Cette organisation semble être le scénario permettant d'obtenir des biocarburants capables de rivaliser avec le pétrole (Lundquist et col., 2010). Cependant les problèmes de contamination sont importants dans cette approche, c'est pourquoi la résistance de la souche doit être considérée comme un point fondamental lors de sa sélection (H. Zhang et col., 2016). La récolte et le séchage représentent également une part très importante du coût total de production, tout comme l'extraction des composés d'intérêt dans le bloc de fractionnement. L'optimisation de cette étape d'extraction est au cœur des préoccupations de cette thèse ; c'est notamment dans cette perspective que les travaux ont été initiés.

2.2. Produits potentiels

Les algues produisent des lipides tels les triacylglycérides (TAG) qui peuvent être convertis en biodiesel, mais également de nombreux autres lipides inutiles à la production de biocarburant (cf. Figure 4). Les lipides extraits peuvent également être à l'origine de compléments alimentaires comme les Omega-3 traditionnellement extraits de l'huile de poisson. Ils peuvent également être une source de produits tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) pour l'industrie pharmaceutique (Singh & Gu, 2010; Yen et col., 2013).

Cependant les lipides ne sont pas les seuls composés issus des microalgues pouvant conduire à des produits à forte valeur ajoutée. Des pigments, des vitamines, des protéines, des enzymes, des

polysaccharides et des microbicides sont également produits (N. K. Singh & Dhar, 2011). Afin de développer avec succès une bioraffinerie fondée sur les microalgues, ces autres produits doivent être également valorisés.

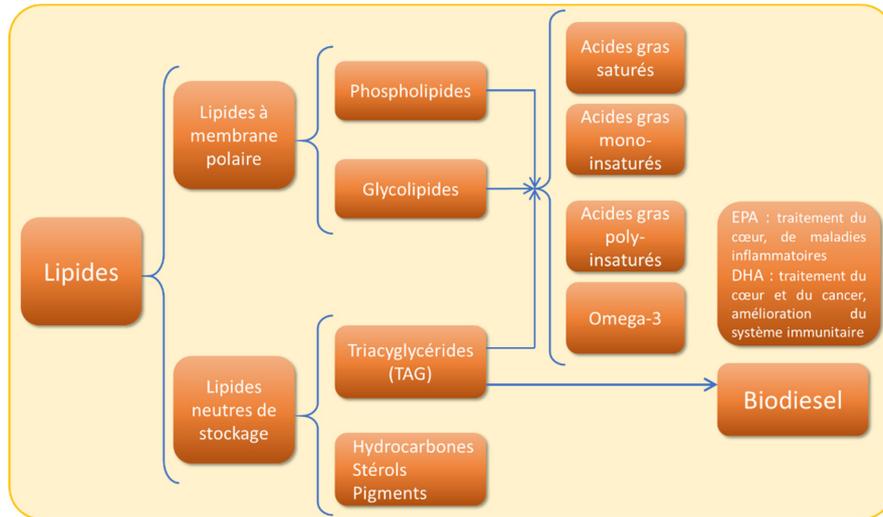


Figure 4 : Biocarburants et produits à forte valeur ajoutée issus de lipides.

2.3. Deux approches

Après concentration de la biomasse, l'huile peut être soit extraite à partir d'algues séchées, soit extraite en phase aqueuse (cf. Figure 5). La première approche est appelée « voie sèche » (« dry route » en anglais), et la seconde, « voie humide » (« wet route ») (Xu et col., 2011). Dans les deux cas, l'extraction de lipides suit une étape de déshydratation par centrifugation qui conduit à un mélange d'une teneur en masse sèche d'environ 15%. En voie sèche, une étape de chauffage suit afin d'assécher le mélange pour produire une pâte d'une teneur en masse sèche supérieure à 85%. Cette approche permet d'obtenir ensuite de hauts rendements d'extraction à partir des méthodes classiques d'extraction de lipides et de mélanges de co-solvants (polaires et non-polaires) (Bligh & Dyer, 1959). Il est intéressant de remarquer que l'ouverture des membranes des microalgues a lieu sous l'action des solvants, si bien qu'aucune étape de désintégration des membranes n'est nécessaire. Malheureusement le séchage de la biomasse est une étape très énergivore qui peut représenter environ 85% de la consommation totale en énergie (Lardon et col., 2009). Dans la seconde approche, la voie humide, l'étape de déshydratation est généralement suivie d'une étape de « désintégration » qui consiste à détruire les membranes cellulaires. Cette voie peut conduire à une balance énergétique positive en s'affranchissant de l'étape de séchage, cependant la biomasse obtenue forme une pâte dont la teneur en matière sèche est faible. La voie humide requiert cependant une désintégration des membranes cellulaires pour augmenter l'accessibilité des lipides (Dong et col., 2016; Yap et col., 2014) ainsi qu'un recyclage d'eau à la fin du bloc de fractionnement. En outre, les méthodes d'extraction utilisées en voie sèche ne fonctionnent pas en voie humide. Les solvants sont souvent immiscibles avec l'eau et l'extraction de lipides polaires, formant des liaisons avec les débris de membranes cellulaires, est rendue plus difficile que celle des lipides neutres. Enfin les lipides polaires libérés peuvent former des émulsions (Dong et col., 2016).

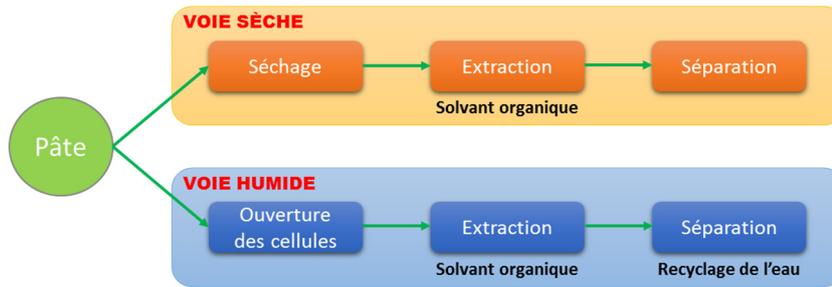


Figure 5 : Représentation des deux voies possibles après l'étape de concentration.

Malgré la simplicité de la voie sèche par rapport à la voie humide, la consommation énergétique de l'étape de séchage fait de la voie sèche une option non viable économiquement (Rashid et col., 2014; Xu et col., 2011; Zeng et col., 2011). La voie humide semble être le seul moyen de développer une bioraffinerie viable fondée sur les microalgues.

C'est donc un traitement des microalgues par voie humide qui sera abordé dans ces travaux de thèse. Plus précisément, ces travaux seront centrés sur l'ouverture de deux types de microalgues eucaryotes particulièrement intéressantes dans le cadre de la bioproduction : *Nannochloropsis gaditana* et *Phaeodactylum tricornutum*. La première d'entre elles appartient au phylum Ochrophyta et l'autre à celui des Bacillariophyta (appelé couramment Diatomés) ; ces deux espèces sont productrices de triacylglycérides. Leurs formes externes diffèrent fondamentalement : *Nannochloropsis* s'apparente à une cellule sphérique de quelques micromètres de diamètre tandis que *Phaeodactylum* sera étudiée sous la forme de bâtonnets d'une dizaine de micromètres de long.

3. Analyse des constituants de bactéries

Ce travail de thèse s'inscrit également dans un but autre que celui décrit précédemment. Il s'agit d'utiliser la technique de lyse imaginée, dans le cadre de l'analyse de microorganismes.

3.1. Différents types d'analyses

Aujourd'hui de nombreuses techniques d'analyses sont disponibles en laboratoire. De manière non exhaustive les techniques suivantes peuvent être listées :

- La mise en culture et la mesure du taux de survie,
- L'observation au microscope des cellules,
- La cytométrie de flux permettant de compter et caractériser les cellules selon leurs propriétés optiques,
- La méthode ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay ») permettant notamment l'identification des protéines,
- L'électrophorèse pour l'identification d'ADN, d'ARN ou de protéines, appelées respectivement Southern, Northern et Western Blot,
- Les méthodes d'amplification de l'ADN.

Alors que les trois premières techniques listées requièrent des cellules intactes, les suivantes requièrent généralement une étape de libération du contenu intracellulaire. Des méthodes adaptées de lyse cellulaires doivent donc être employées en amont de l'analyse.

Ce travail de thèse est focalisé sur l'analyse d'organismes unicellulaires procaryotes : des bactéries faciles à cultiver et représentatives de différents domaines d'applications tels l'analyse de la qualité de

l'air ou de l'eau, la détection de pathologies chez l'homme, etc. Les analyses effectuées dans cette thèse seront réalisées à partir de techniques d'amplification de l'ADN telle que la PCR (« polymerase chain reaction »).

Toutefois, la PCR requiert des cycles de températures qui rendent la technique longue et peu adaptée aux analyses « sur le terrain ». Cependant, le développement récent de techniques d'amplification isotherme de l'ADN permet d'envisager ce type d'analyses. L'amplification isotherme de l'ADN fera l'objet d'une étude dans le dernier chapitre de cette thèse. Le concept de systèmes permettant l'analyse « sur le terrain » est présenté dans le paragraphe suivant.

3.2. Développement de systèmes d'analyse d'échantillons bruts

Les systèmes d'analyse intégrant la préparation d'échantillon (systèmes de type « sample-in » to « answer-out ») émergent car ils permettent de réduire considérablement les risques de contamination, de simplifier les manipulations nécessaires à l'analyse et souvent également de réduire les temps d'analyse et la consommation d'énergie (Jungkyu Kim et col., 2009). En outre, ce type de système peut facilement être conçu de façon à être portable.

Ces systèmes autonomes sont développés à l'échelle microfluidique sous forme de laboratoire sur puce (« lab-on-chip »). Ils permettent d'effectuer sur le même dispositif la collecte de l'échantillon, la lyse cellulaire et l'analyse du contenu. En raison de la complexité de ces systèmes intégrant à la fois l'étape de préparation et l'étape d'analyse, peu de dispositifs ont connu un développement industriel. Dans ce travail de thèse, une technique de lyse pouvant être intégrée dans ce genre de systèmes est étudiée.

4. Différentes techniques de lyse

Compte tenu de son importance en biologie la lyse a d'ores et déjà fait l'objet de multiples recherches et plusieurs techniques ont aujourd'hui été développées à plus ou moins grande échelle. Dans le présent paragraphe ces techniques sont classées selon leur mode d'action. Quatre modes seront distingués :

4.1. Méthodes chimiques

4.1.1. Choc osmotique

L'osmose fait référence au passage d'un liquide à travers une membrane semi-perméable d'une zone où la concentration est faible à une zone où la concentration est plus élevée. La différence de concentration entre les deux côtés de la membrane semi-perméable engendre une pression osmotique sur la membrane. Les membranes cellulaires étant semi-perméable, elles subissent une pression osmotique lorsqu'elles sont placées dans un milieu où la concentration est différente de celle à l'intérieur de la cellule. Ainsi des cellules placées dans une solution faiblement concentrée en sel subiront un flux d'eau dirigé vers leur intérieur. Elles se gonfleront alors et peuvent exploser (cours de Margaritis, 2007). Dans le cas des microalgues par exemple, c'est une méthode prometteuse pour récupérer l'huile avec des espèces telles que *Botryococcus* sp. MPCC32 sensibles à cela (Rakesh et col., 2015). Combinée à un solvant organique cette technique d'extraction a permis d'obtenir une quantité d'huile deux fois supérieure à celle obtenue lors de l'utilisation d'un solvant seul (Byreddy et col., 2015). Cependant l'efficacité de cette technique est très variable selon les espèces et certaines d'entre

elles peuvent résister à une pression osmotique élevée. La lyse par choc osmotique ne peut donc pas être appliquée de la même manière à toutes les microalgues (Yoo et col., 2012).

4.1.2. Détergents

Les détergents sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire composées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Cette structure leur permet de solubiliser des molécules telles que les constituants des membranes (notamment les lipides). Cette technique est efficace mais dénature souvent les protéines et pollue les produits obtenus.

4.1.3. Traitement alcalin

La méthode d'extraction alcaline par exemple est fondée sur l'utilisation d'un mélange d'un surfactant tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS) avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH). Cette méthode a été développée pour extraire l'ADN des cellules (Birnboim & Doly, 1979). Harun et col. (2011) utilisèrent l'hydroxyde de sodium pour libérer et fragmenter des polysaccharides contenus dans les parois de microalgues de la souche *C. infusionum*. D'après les auteurs l'hydroxyde de sodium rompt les parois cellulaires en clivant les liens intermoléculaires entre les hémicelluloses et les autres composants polymériques. Leur étude montre qu'un pré-traitement alcalin sur les microalgues peut améliorer l'extraction de sucres et donc la production de bioéthanol.

Des traitements oxydants utilisant le peroxyde d'hydrogène peuvent également être mis en place dans le but de détruire les composants carbonés de la membrane cytoplasmique. C'est par ailleurs une technique classique de désinfection des eaux polluées (Dang, 2011).

4.1.4. Solvants organiques

Les solvants organiques tels que l'acétone, le chloroforme, le cyclohexane, l'éthanol, l'hexane, le méthanol ou un mélange de ceux-ci, détruisent les membranes cellulaires et dissolvent les lipides. Pour les microalgues, en raison du pourcentage élevé d'huile récupérée, l'extraction par solvant est devenue la méthode d'extraction d'huile et de graisses la plus populaire (Topare et col., 2011). Dans une étude comparative de treize solvants, Ramluckan et col. (2014) ont montré que pour une extraction à l'aide d'un seul solvant par la méthode soxhlet, le chloroforme, l'éthanol et l'hexane offrent les meilleurs rendements d'extraction de lipides avec des efficacités de l'ordre de 10 à 11%. Ces auteurs ont également évalué les mélanges binaires de solvants. Parmi les mélanges testés, le plus efficace a été un mélange 1:1 de chloroforme:éthanol. Ce mélange permet d'extraire des lipides avec un rendement de 11,76% tandis que le meilleur solvant, le chloroforme, permet d'atteindre 10,78%. Cependant les solvants doivent être éliminés des produits au terme de l'extraction. En outre ils peuvent réagir avec les composés d'intérêt et dénaturer les protéines.

4.1.5. Fluides supercritiques

La méthode d'extraction fondée sur les fluides supercritiques exploite l'augmentation du pouvoir de solvatation des fluides lorsqu'ils sont amenés au-dessus du point critique de température et de pression (Mercer & Armenta, 2011). Parmi les différents fluides possibles, le dioxyde de carbone est caractérisé par un point critique de température et de pression relativement bas. Halim et col. (2011) ont montré dans une étude comparative que l'extraction soxhlet en utilisant l'hexane est significativement moins efficace qu'une extraction à l'aide de dioxyde de carbone supercritique, permettant d'atteindre des rendements d'extraction des lipides comparables chez *Chlorococcum* sp. en 5,6 fois moins de temps. L'extraction au dioxyde de carbone supercritique permet également une

meilleure sélectivité pour l'extraction des triglycérides qu'avec une extraction à l'aide de solvant (Cheng et col., 2011).

Le procédé fondé sur le dioxyde de carbone ne laisse pas de trace dans les produits finaux étant donné que le fluide est à l'état gazeux à température ambiante. C'est donc une solution privilégiée pour l'extraction des produits à haute valeur ajoutée. Malheureusement les algues doivent être d'abord séchées avant le traitement ; or le séchage est un procédé très coûteux (aussi bien en termes d'énergie que financièrement). En utilisant du méthanol, Patil et col. (2011) évitèrent ce problème et firent la démonstration d'un procédé supercritique en une seule étape permettant simultanément l'extraction et la transestérification de la biomasse humide pour la production de biodiesel.

4.1.6. Digestion enzymatique

Des enzymes peuvent être utilisées pour digérer spécifiquement des composants de la membrane des cellules. Le traitement enzymatique peut avoir un impact important sur la perméabilité des parois des cellules et peut être utile en complément d'une technique de lyse, en particulier les lysozymes et certaines autres enzymes. Le traitement peut détruire partiellement ou complètement les membranes (Mercer & Armenta, 2011). En raison de l'activité très spécifique des enzymes, cette technique peut être considérée comme douce. Mais en règle générale elle fragilise simplement les membranes plutôt qu'elle ne les détruit vraiment. Ainsi la digestion enzymatique sera plutôt utilisée en complément d'une autre technique de lyse (cours de Margaritis, 2007). Les enzymes sont hélas très chères ; un développement à grande échelle de cette technique est donc limité par son coût.

4.2. Lyse mécanique

Ce type de lyse consiste à appliquer une contrainte mécanique importante au niveau de la membrane cellulaire. Il peut s'agir de forces de frottement, forces de cisaillement ou de chocs de pression (Nan et col., 2014). Une lyse mécanique peut être obtenue via plusieurs approches :

4.2.1. Approche optique

La lyse par voie optique est effectuée en émettant une impulsion laser dans une solution contenant les cellules à lyser. Ce dépôt d'énergie très localisé engendre la formation d'un plasma conduisant à la croissance et au collapse d'une bulle de gaz dans le liquide. L'impulsion laser est généralement émise pour une durée de quelques nanosecondes à une longueur d'onde de 532 nm (Lai et col., 2008; Rau et col., 2006) ou 1064 nm (A. Vogel et col., 1996).

Lors de la formation du plasma et lors du collapse de la bulle de gaz, des ondes de choc sont émises et peuvent conduire à la lyse (Brown & Audet, 2008). Rau et col. (2006) mirent en évidence le rôle principal de la phase de croissance de la bulle sur la lyse de cellules adhérentes à surface ; ces dernières sont alors déchirées sous l'action de forces de cisaillement.

4.2.2. Approche acoustique

La génération d'ondes ultrasonores permet de créer des régions de basses pressions pour former des bulles de cavitation capables, lors de leur formation et leur effondrement, de lyser les cellules. La gamme de fréquences de 20 kHz à 50 kHz est souvent considérée comme la plus efficace pour induire de la cavitation (Canselier et col., 2002; Kim et col., 2013). Cependant les bulles de cavitation atténuent la transmission des ultrasons (Greenly & Tester, 2015) et la fréquence de désintégration adaptée dépend des propriétés mécaniques de la cellule (Yamamoto et col., 2015). Cette technique entraîne souvent un échauffement de la solution qui peut dénaturer les protéines et elle consomme beaucoup

d'énergie. C'est une méthode de lyse nécessitant plusieurs secondes de traitement qui peut en outre dégrader les molécules extraites. Cependant des travaux ont permis de montrer son efficacité sur des spores de bactéries (Marentis et col., 2005) et elle peut être introduite dans des dispositifs sur puce (Nan et col., 2014).

4.2.3. Approche au moyen d'aspérités

Dans leurs articles de revues, Brown & Audet (2008) et Nan et col. (2014) présentent des dispositifs qui engendrent le déchirement de la membrane cellulaire à l'aide de « micro- » ou « nanocouteaux » disposés sur une paroi le long de laquelle s'écoule la solution contenant les cellules à lyser.

4.2.4. Approche par agitation de billes solides

La méthode par agitation de billes (« bead milling » en anglais) repose sur la désintégration des membranes cellulaires dans une cuve contenant des billes agitées violemment. La rupture des membranes est liée à un broyage des cellules entre les billes, mais également de collisions avec les billes. L'efficacité du procédé dépend de nombreux paramètres tels que le diamètre des billes et leur concentration, la concentration en microorganismes, le mouvement et la vitesse d'agitation, le débit de solution et la température. La méthode de broyage par agitation de billes est considérée comme l'une des techniques les plus efficaces pour rompre les membranes cellulaires (Chisti & Moo-Young, 1986) mais sa consommation énergétique intense fait obstacle à son utilisation à grande échelle.

4.2.5. Approche par homogénéisation haute pression

La cavitation peut être produite par la circulation d'un liquide passant dans un venturi. La vitesse du liquide augmente dans le col et ainsi la pression chute. Si la pression devient inférieure à la pression de vapeur saturante alors des bulles de cavitation apparaissent. Plus tard, lorsque la pression augmente ces bulles collapseront violemment et produisent des ondes de choc qui endommageront les membranes cellulaires (Günerken et col., 2015). Dans leurs travaux, Jubeau et col. (2013) mirent en évidence la sélectivité de cette méthode d'extraction d'un pigment sur la microalgue *Porphyridium cruentum*.

4.3. Lyse thermique

L'élévation de la température provoque la rupture de la chaîne phospholipidique constituant la membrane de la cellule chez certaines espèces. Cependant de nombreuses cellules dites thermorésistantes ne sont pas sensibles à cet effet. L'effet de l'élévation de température pour lyser les membranes est donc relativement limité ; néanmoins cette technique est intéressante car elle est simple à intégrer sur des laboratoires sur puces (Nan et col., 2014).

4.4. Lyse électrique

Les membranes de microorganismes peuvent être perméabilisées sous l'effet d'un potentiel transmembranaire d'environ 0,2-1V (Chen, et col., 2006). Cette technique appelée **électroporation** permet à la fois la lyse de petites cellules (avec des champs électriques de l'ordre de 10 kV.cm⁻¹ pour lyser des microorganismes de 1 à 2 µm de diamètre) et celle de cellules plus grosses (avec des champs de l'ordre de 1,5 kV.cm⁻¹ pour ouvrir des protoplastes de 20 à 40 µm).

Afin de limiter les risques d'électrolyse et de chauffage par effet Joule, les champs électriques sont souvent pulsés. Lorsque l'intensité et la durée de l'exposition au champ électrique sont respectivement

faibles et courts, les pores peuvent se refermer spontanément. En revanche, avec des intensités plus importantes et des temps d'exposition longs, la membrane cellulaire est détériorée de façon irréversible, ce qui conduit à la lyse de la cellule et à sa mort (Bao et col., 2010). Les trous formés dans la membrane peuvent favoriser les transferts de masse rendant ainsi l'électroporation une technique de lyse efficace. Cette technique est également facile à intégrer puisqu'elle ne nécessite que deux électrodes dans le dispositif.

5. Une technique innovante fondée sur des décharges haute tension

5.1. Similitudes avec la lithotripsie

Dans ce travail de thèse, une technique de lyse fondée sur la génération d'arcs électriques au sein d'une solution peu conductrice va être étudiée. Ces arcs vont être produits en appliquant une différence de potentiel de plusieurs kilovolts pendant quelques microsecondes entre deux électrodes pointues immergées dans la solution contenant les microorganismes à lyser. L'apparition d'un arc électrique dans la solution a pour conséquence notable la production d'ondes de choc (Hoffer, 2014). La technique de lyse envisagée dans cette étude reposera sur l'exploitation de ces ondes de choc pour détruire les membranes des microorganismes. De ce point de vue, ce procédé de lyse se rapproche de celui développé par Broyer et son équipe (1995) pour la lithotripsie. La technique envisagée peut également être comparée aux techniques de lyse utilisant un laser pour produire une bulle de cavitation dont l'effondrement va également entraîner la production d'ondes de choc. Cependant elle devrait être plus simple à concevoir et à fabriquer ; l'utilisation directe de l'énergie électrique devrait en outre permettre d'éviter des étapes de conversion d'énergie, dans le but de concevoir un système peu énergivore. A notre connaissance, aucun travail visant ces objectifs n'a encore été mené dans le cadre de la lyse de microorganismes par ondes de choc.

5.2. Une décharge électrique aux effets multiples...

Outre les effets mécaniques associés à la génération d'une onde de choc, la décharge électrique en milieu aqueux engendre une multitude d'autres effets de natures électrique, chimique ou encore thermique (Broyer, 1995). A partir de ce constat, la technique de lyse par décharges électriques devrait être davantage efficace puisqu'elle permettra le couplage de différents effets conduisant à la lyse. Nous attendons ainsi un rendement énergétique élevé.

Les différents effets engendrés par la décharge seront listés et leurs intensités seront évaluées dans le chapitre 3. Nous verrons alors quels effets ont de l'importance dans la lyse de microorganismes et lesquels peuvent être négligés. Ces effets seront ensuite testés sur les microorganismes d'intérêt dans les chapitres suivants.

5.3. ... à une échelle millifluidique

L'étude est menée dans un dispositif dont les dimensions caractéristiques sont de l'ordre du millimètre. Ce choix permet avant toute chose de confiner l'énergie déposée lors de la décharge haute tension (Obreschkow & Dorsaz, 2011), toujours dans l'optique de concevoir un système efficace. En outre, il rend possible la conception de systèmes miniaturisés d'analyses (cf. section 3.2).

Chapitre 2

Production d'ondes électrohydrauliques

Ce chapitre s'intéresse aux conséquences électrohydrauliques d'une impulsion haute tension dans l'eau, en particulier lorsque cette tension conduit au claquage diélectrique du liquide. Cette partie servira de fondement pour la compréhension des travaux effectués dans la suite de cette thèse.

Les observations et mesures présentées dans ce chapitre sont effectuées dans l'eau, en l'absence de tout microorganisme d'intérêt.

1. Mécanismes de formation d’arcs électriques entre deux électrodes immergées

Si les mécanismes de décharges électriques dans un gaz sont aujourd’hui plutôt bien connus, ce n’est malheureusement pas le cas de ceux dans les liquides qui font aujourd’hui encore l’objet de nombreuses recherches dont les conclusions ne sont pas toujours les mêmes (Boussetta & Vorobiev, 2014). Ce premier paragraphe propose un bref état de l’art sur les décharges haute tension, d’abord en rappelant les mécanismes fondamentaux en phase gazeuse, puis en présentant le phénomène de claquage diélectrique en phase liquide, en particulier dans l’eau peu conductrice.

1.1. Etat de l’art

1.1.1. Décharge haute tension dans les gaz

Lorsque qu’un champ électrique est appliqué dans un gaz, différents phénomènes, présentés en Figure 6, peuvent être observés selon l’intensité du champ. Quand la valeur du champ est suffisamment faible on assiste à un phénomène non visible au cours duquel des électrons circulent entre les électrodes sans multiplication, appelé collection simple. Au-delà d’un champ critique, l’énergie cinétique des électrons en circulation peut devenir suffisante pour ioniser les molécules de gaz lors d’un choc avec celles-ci. Au cours de ce phénomène d’avalanche électronique, appelé « décharge Townsend », la quantité d’électrons en circulation augmente de façon exponentielle. Des électrons secondaires sont également émis (cours de Pierre Zweiacker, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne). Les zones dans lesquelles le gaz est fortement ionisé forment des branches ramifiées lumineuses, appelées streamers. L’apparition de ce plasma, très conducteur et lumineux, s’accompagne de l’apparition de phénomènes chimiques, sonores et thermiques. Si la tension appliquée continue à croître jusqu’à dépasser une certaine tension définie par la loi de Paschen, une zone suffisamment importante de gaz entre les électrodes est ionisée. Il y a alors formation d’un arc entre les électrodes.

Il est à noter la possibilité d’un phénomène de décharge lumineuse stable dans certaines configurations : tube fluorescent contenant certains types de gaz à basse pression, ou ampoule à haute pression.

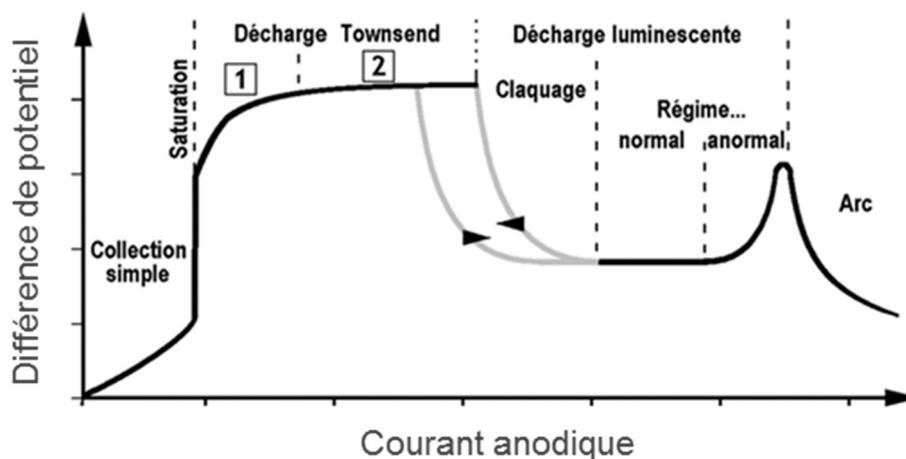


Figure 6 : Représentation schématique sur un graphique courant-tension des différents phénomènes de décharge dans les gaz, tirée du cours de Master de Pierre Zweiacker, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.

1.1.2. Phénomène de claquage diélectrique d’un liquide faiblement conducteur

Le phénomène de claquage diélectrique et l’apparition d’un arc électrique sont également observables dans les liquides lorsque la tension entre les électrodes est suffisante. Comme dans les gaz, cet arc électrique est très lumineux (cf. Figure 7) et s’accompagne de phénomènes chimiques, mécaniques, et thermiques (Boussetta & Vorobiev, 2014).

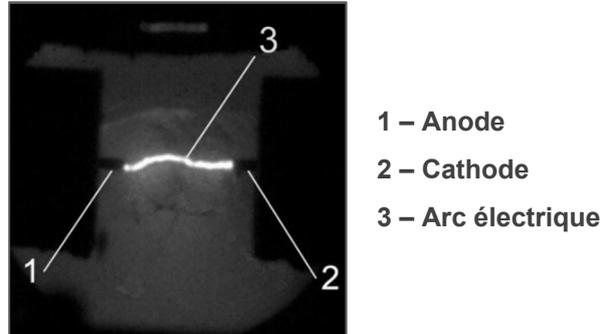


Figure 7 : Image d’un arc électrique dans l’eau obtenue par ombroscopie (Pinchuk & Kolikov, 2012).

Les conditions d’apparition de ce phénomène de claquage dans les liquides ont fait l’objet de nombreuses recherches depuis les années 1970 en particulier dans des liquides isolants tels que les huiles employées dans l’isolation des transformateurs haute tension.

Afin d’établir les conditions d’existence de l’arc électrique entre les électrodes, une étape de « préclaquage » est nécessaire (Tobazeon, 1997). Au cours de cette étape, il est possible d’observer (à l’aide d’une caméra dans le visible) des figures lumineuses et ramifiées qui prennent naissance en général au voisinage d’une électrode, puis se développent dans le liquide. Ces figures lumineuses sont appelées des « *streamers* » (terme anglais n’ayant reçu aucune traduction française). Cette étape de préclaquage peut elle-même être divisée en plusieurs sous-étapes. Nous ne distinguerons ici que deux phases :

- une phase de **génération** pendant laquelle se créent les circonstances favorables à l’apparition de streamers.
- une phase de **propagation** à grande vitesse (de l’ordre de 1 km.s^{-1}) ou très grande vitesse (supérieure à 100 km.s^{-1}) des streamers.

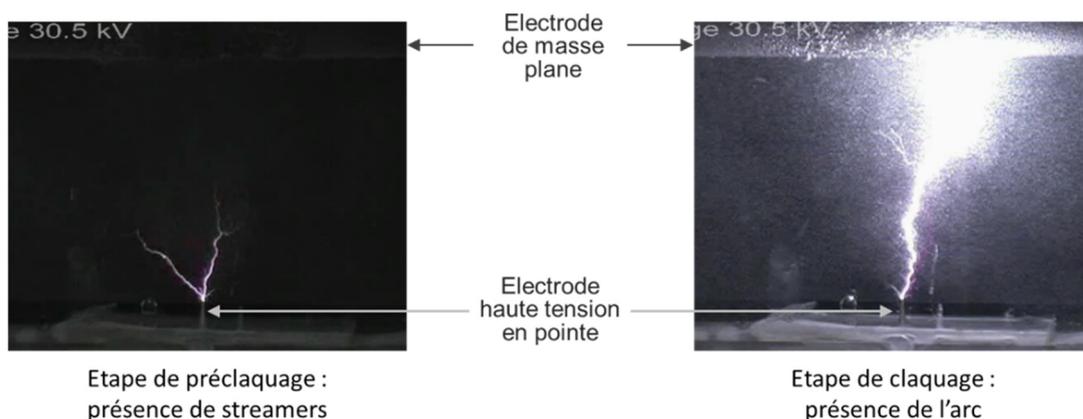


Figure 8 : Exemples de développement de streamers et d’arc dans l’eau suite à l’application de haute tension en configuration pointe-plan (Images obtenues par le département “Water and Air Purification” de l’institut “of Fluid-Flow Machinery Polish Academy of Sciences” - <https://www.imp.gda.pl/en/research-centres/o3/o3z4/research/>).

Dans l’état de l’art actuel, il est possible de trouver deux mécanismes principaux de propagation de ces streamers qui, même s’ils peuvent se produire conjointement, font aujourd’hui encore l’objet de

discussions entre spécialistes (Boussetta & Vorobiev, 2014). Selon l’un de ces mécanismes, que l’on peut traduire de l’anglais par « théorie à partir des bulles », une étape de formation d’une phase gazeuse est nécessaire à l’apparition des streamers. Ces bulles peuvent apparaître suite à la vaporisation d’une partie du liquide par effet Joule à proximité des électrodes en pointe où le champ électrique est le plus intense, ou être liées à la présence de gaz dissous ou d’impuretés dans le liquide. Un arc électrique se forme dans le gaz contenu dans la bulle. La chaleur fournie par l’arc électrique entraîne la vaporisation d’une partie de liquide adjacente à la microbulle, permettant la formation d’un arc électrique dans la nouvelle bulle formée. L’arc électrique formé entre les électrodes de décharge au terme de la phase de propagation des streamers résulte donc d’une série de microclaquages dans des bulles de gaz (cf. Figure 9).

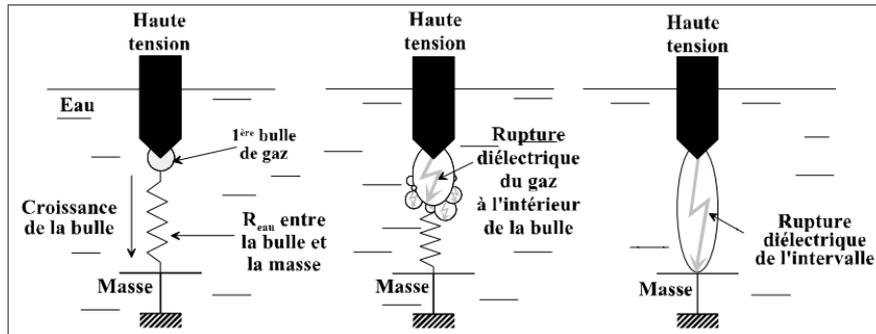


Figure 9 : Mécanisme d'apparition de l'arc électrique en configuration pointe-plan dans l'eau faiblement conductrice selon la "théorie à partir des bulles" (issu de Touya, 2005).

Selon le second mécanisme, dit « théorie électronique », une phase gazeuse n’est pas nécessaire et les streamers peuvent se former directement au sein du liquide. Les électrons ayant une énergie suffisante sont capables d’ioniser les molécules sur leur passage et de déclencher un phénomène d’avalanche électronique de la même façon que dans les gaz. Cette théorie est historiquement la première admise, mais semble entrer en contradiction avec plusieurs propriétés de certains liquides (Dors, 2011). La théorie électronique expliquerait plutôt le développement des streamers à très grande vitesse (vitesses supersoniques), tandis que la théorie à partir des bulles s’applique pour le développement de streamers à des vitesses subsoniques (Touya et col., 2006).

Lorsque le streamer s’est propagé jusqu’à l’électrode de décharge, un arc électrique apparaît entre les deux électrodes. Cet arc forme une poche de plasma, dont les valeurs de température et de pression sont très élevées. La présence de cette poche de gaz ionisé va engendrer différents phénomènes : génération de radicaux libres, production de lumière dans le spectre visible, ultra-violet et infrarouge, génération d’ondes de choc, développement d’une bulle instable de gaz, échauffement de la solution. Les conséquences de cet arc électrique seront étudiées plus en détail dans la suite de cette thèse, afin de déterminer leurs impacts sur des micro-organismes d’intérêt.

1.2. Choix d’une configuration

Les études présentées dans ce mémoire furent menées avec les électrodes en configuration dites « pointe-pointe » alignées ; ainsi les deux électrodes sont-elles identiques et disposées de façon coaxiale. Cette configuration diffère de la configuration « pointe-plan » couramment employée dans laquelle le champ très divergent favorise l’observation des étapes de préclaquage du côté de l’électrode pointue (Tobazeon, 1997). Dans notre cas, la configuration pointe-pointe a pour avantage de localiser précisément la zone de formation de l’arc électrique. En outre, sur le plan hydraulique, dans cette configuration la finesse des électrodes limite leur impact sur les écoulements que l’on cherche à étudier : la propagation d’ondes de choc et le développement de bulles de gaz ou de vapeur.

Le générateur utilisé développera des puissances de l’ordre du Joule. L’utilisation d’un commutateur ultra-rapide permettra de délivrer l’énergie stockée dans des condensateurs en des temps de l’ordre de la centaine de nanosecondes.

2. Matériels et méthodes

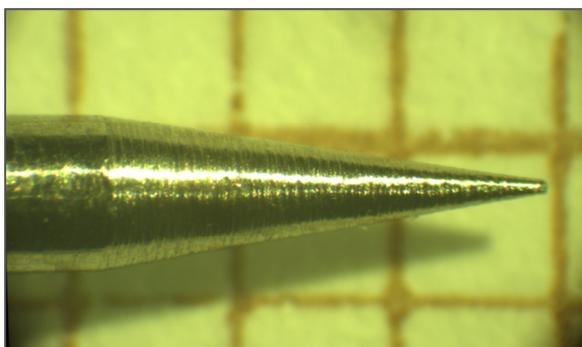
Le banc de manipulation est constitué autour de la cuve d’étude et composé de différents instruments de mesures qui sont présentés dans les paragraphes suivants.

2.1. Fabrication de la « cuve infinie »

Afin de pouvoir observer les phénomènes au niveau des électrodes de décharge, la cuve est fabriquée dans un matériau transparent dans les longueurs d’onde du visible. La cuve est un assemblage de plaques de polymère plastique, le PMMA (Polyméthacrylate de méthyle), de 8 mm d’épaisseur. Les dimensions de ces plaques sont : 184x184 mm pour le fond, 184x200 mm pour deux faces opposées et 200x200 mm pour les deux autres faces opposées. Le haut de la cuve est ouvert, laissant une surface libre lorsqu’elle est remplie de liquide.

Les plaques de 184x200 mm sont percées en leurs centres afin de permettre le passage des électrodes de décharge. Ces électrodes sont des baguettes métalliques en acier inoxydable, d’un diamètre initial de 8 mm se rétrécissant en baguettes de 0,95 mm de diamètre, terminées en pointes coniques de 30° d’angle du côté intérieur à la cuve (cf. Figure 10-a). Les baguettes traversent les plaques de PMMA dans des supports cylindriques en acier, de 2 cm de diamètre. Ces supports sont vissés dans la plaque avec l’ajout d’un film en téflon pour assurer l’étanchéité au niveau des pas de vis. Enfin, à l’intérieur de la cuve, les baguettes métalliques sont recouvertes de gaine thermorétractable jusqu’à 5 mm de l’extrémité de la pointe afin de limiter le risque d’électrolyse le long de celles-ci. De la graisse silicone est également ajoutée au niveau des jonctions des gaines pour empêcher l’infiltration de liquide entre la gaine et la baguette.

Compte tenu de l’écartement des électrodes, proche du millimètre, et des dimensions caractéristiques des phénomènes attendus, cette cuve sera considérée comme une « cuve infinie » (cf. Figure 10-b). Elle permettra d’étudier les conséquences d’une décharge électrique sans paroi à proximité du foyer des électrodes.



(a)



(b)

Figure 10 : Photographies (a) de la pointe d'une électrode déposée sur du papier millimétré, (b) de la cuve "infinie" sans liquide.

2.2. Conception et fabrication de la « cuve en U »

Le motif de la cuve est usiné sur une face d’une plaque de COC (Cyclic Olefin Copolymer) de 3,15 mm d’épaisseur (Topas® 5013S-04) à l’aide d’un robot Charly4U™ de CharlyRobot. La cuve est ensuite formée par l’assemblage de deux cartes scellées par thermocollage dans une presse à 127°C pendant 80 minutes (cf. Figure 11-a). La cuve est en forme de U dont les côtés ont une longueur de 34 mm et sont espacés de 6 mm. Les électrodes sont insérées dans les canaux débouchant suivant des sections carrées de 1 mm de côté, puis collées avec une colle UV Masterbond (UV15X-2). Ces électrodes sont des baguettes en acier inoxydable type AISI 302 de 0,95 mm de diamètre et 55 mm de long, terminées en pointes coniques de 30° d’angle du côté intérieur à la cuve. Les pointes des électrodes sont espacées de 1 mm puis collées. L’assemblage final est présenté en Figure 11-b.

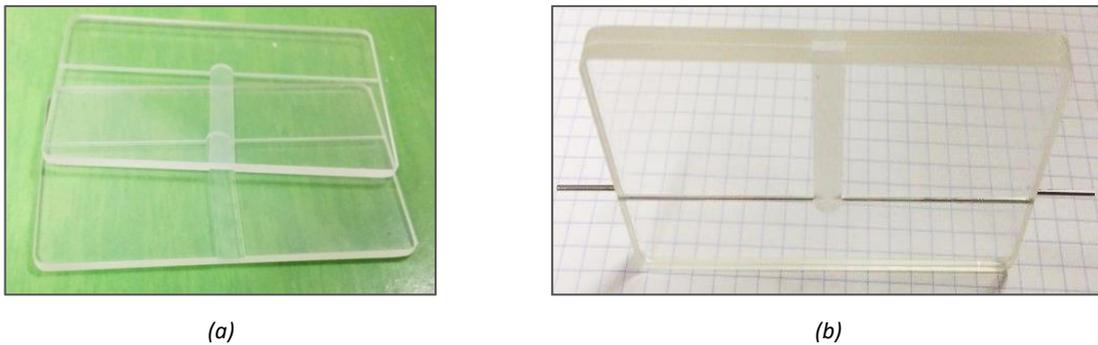


Figure 11 : Photographies des cartes : (a) avant assemblage, (b) cuve en U.

2.3. Générateur de haute tension

Le générateur haute tension utilisé dans le banc d’étude est un appareil commercial (GBS Elektronik, RUP_3-10 OEM) présenté schématiquement en Figure 12 et photographié en Figure 13-a. La haute tension est produite à l’aide d’une bobine couplée à un montage de Greinacher à plusieurs étages. A la sortie de ce montage, la haute tension continue alimente une résistance notée $R_{\text{chargement}}$ en série avec une capacité C dans le but de la charger.

Ce générateur utilise un interrupteur à transistors haute tension (Behlke, HTS 111-06-GSM) pour former l’impulsion haute tension. Malgré sa fragilité manifeste – ce composant a dû être changé deux fois au cours de ce travail de thèse – l’interrupteur à transistors a comme avantages d’être simple d’utilisation, de présenter des temps de réponse extrêmement courts (temps de montée et de descente de l’ordre de 20 ns) et de posséder une résistance de contact très faible. Le circuit de décharge est composé d’une résistance de protection $R_{\text{protection}}$ en série avec la cuve de résistance notée R_{cuve} . Cette résistance a pour principal rôle, de protéger l’interrupteur haute tension à transistors lorsque la résistance R_{cuve} devient très faible (c’est-à-dire lors de la présence de l’arc électrique entre les électrodes de décharge). Le montage électrique équivalent peut être représenté simplement par le schéma en Figure 12.

Le générateur de haute tension est piloté par un signal TTL (niveau logique bas entre 0 et 1,4 V et niveau haut entre 2,4 et 5 V). L’intensité du courant et la tension électrique délivrées à la sortie du générateur peuvent être mesurées à l’aide d’un oscilloscope externe. La conception électrique du générateur haute tension (cf. Annexe 2) permet de fournir sur l’une des bornes de mesure une tension proportionnelle à l’intensité du courant de sortie (1 volt pour 1 ampère en sortie), et sur l’autre borne, une tension proportionnelle à la tension de sortie (1 volt pour 1 kilovolt en sortie). L’alimentation du générateur haute tension est commandée par un dispositif de sécurité : le générateur ne peut être

allumé que lorsqu’un capot en plexiglas est rabattu au-dessus du montage utilisant la haute tension. Toute intervention de l’utilisateur sur le montage mettra hors tension le générateur.

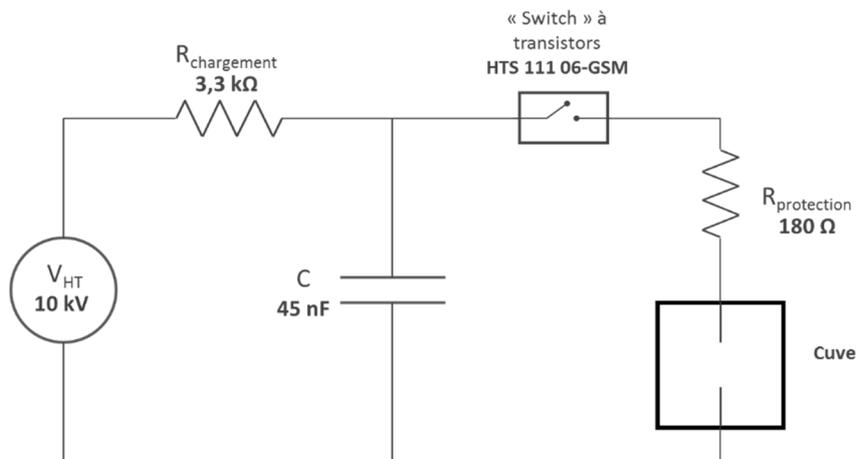
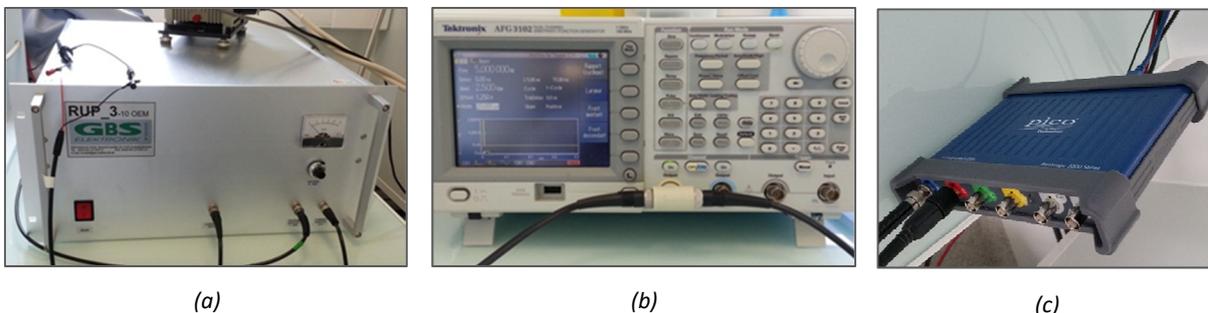


Figure 12 : Schéma électrique simplifié du générateur relié à la cuve.

2.4. Générateur d’impulsion et oscilloscope numérique

Afin de fournir le signal TTL nécessaire au contrôle de la haute tension, un générateur de signaux (Tektronix, AFG3102C, cf. Figure 13-b) émet des impulsions de 5 V, d’une largeur de quelques microsecondes à une centaine de microsecondes. Ces impulsions peuvent également être répétées à une fréquence choisie. Une seconde sortie TTL permet de synchroniser un appareil externe tel qu’une caméra rapide avec le déclenchement de l’impulsion.

Comme décrit dans le paragraphe 2.3, les caractéristiques du signal de sortie du générateur haute tension (courant et tension) peuvent être suivies à l’aide d’un oscilloscope externe. Afin de réaliser ce suivi, un oscilloscope numérique Picoscope 3404A (cf. Figure 13-c) est utilisé. Cet oscilloscope USB permet d’enregistrer des signaux avec une fréquence d’échantillonnage jusqu’à 10^9 échantillons/s. Les signaux acquis par l’oscilloscope peuvent être exploités à l’aide du logiciel PicoScope 6 et éventuellement exportés sous forme de tableaux pour être traités avec un logiciel de calcul (par exemple MatLab).



2.5. Acquisition vidéo ultra-rapide

Les acquisitions vidéo sont obtenues à l’aide de la caméra rapide FastCam SA1.1 commercialisée par Photron. Equipée d’un capteur CMOS 12 bits, cette caméra permet d’acquérir des vidéos contenant jusqu’à 675000 images par seconde. Les images obtenues ont une résolution maximale de 1024x1024 pixels pour des vidéos jusqu’à 5400 images/s, puis une résolution dégressive lorsque la vitesse d’acquisition augmente, jusqu’à 64x16 pixels pour un film à 675000 images/s. La caméra est équipée d’un objectif Nikon AF Micro-Nikkor 60 mm f/2.8 D permettant une mise au point relativement proche et une ouverture maximale du diaphragme assez importante (ce qui est nécessaire pour obtenir des images lumineuses lorsque la vitesse d’acquisition est rapide).

L’éclairage de la zone d’intérêt (dans un premier temps le foyer des électrodes de la cuve) est effectué par rétroéclairage à l’aide d’un panneau lumineux à LED commercialisé par Stemmer Imaging. Le modèle utilisé ici, noté PHLOX-LEDW-BL-100x100-SLLUB, est une dalle carrée de 10 cm de côté offrant une luminance de 50 000 cd/m². Cette dalle est alimentée en courant continu délivré par une alimentation 24 V portant la référence CCS-PD2.

Une autre solution fréquemment retrouvée dans la littérature consiste à utiliser un laser couplé avec une photodiode. Ce montage a pu être réalisé et a permis d’effectuer des travaux préliminaires. C’est une solution peu chère mais plus difficile à mettre en œuvre que l’utilisation d’une caméra ultra-rapide.

2.6. Capteur de pression

Un capteur de pression est immergé dans la cuve infinie, à 7 cm du foyer des électrodes de décharge. Le capteur utilisé est un hydrophone en forme d’aiguille de 1 mm de diamètre (Precision Acoustics, 1mm needle hydrophone). Ce capteur de bande-passante étendue (de 5 kHz à 20 Mhz) peut être utilisé dans des cuves de plus petites tailles. Bien qu’une position proche eût été souhaitable pour les mesures de pression, l’intensité du champ électrique élevée limite la proximité du capteur. En effet lors des essais en approchant trop le capteur des électrodes, ce dernier a été détruit.

2.7. Vue d’ensemble du banc d’étude

L’ensemble des manipulations est effectué dans une salle grise (ISO 5) dont la température, la pression et le taux d’humidité sont respectivement maintenus à 21°C, 1013 hPa, 50%.

La cuve « infinie » est remplie d’eau courante, dont la conductivité a été mesurée une fois par semaine pendant la durée des expériences et vaut 51,6 ($\pm 1,0$) mS/m.

Le schéma et la photographie en Figure 14 présentent une vue d’ensemble du banc utilisé au cours de cette étude :

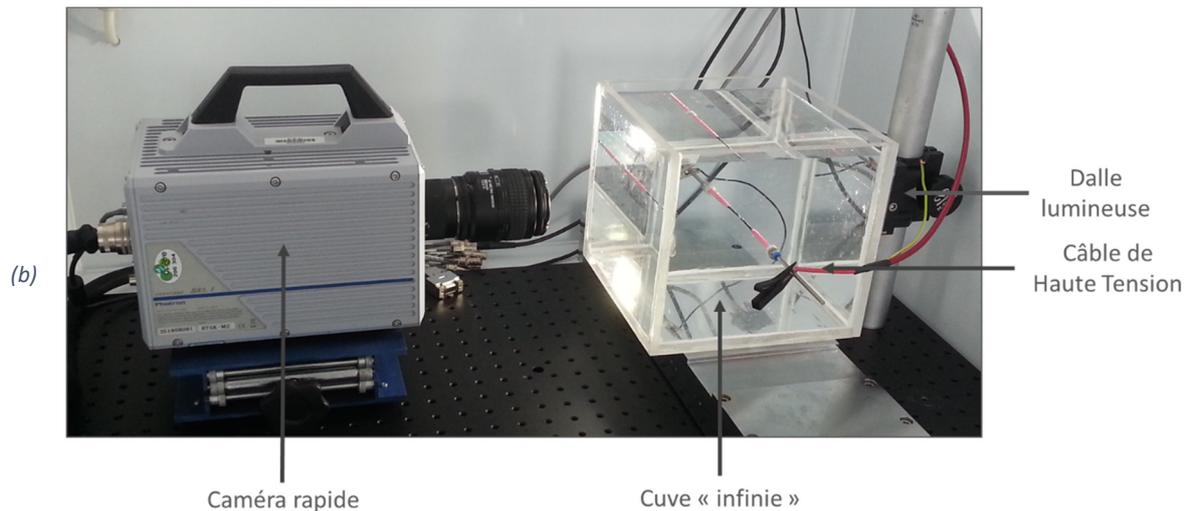
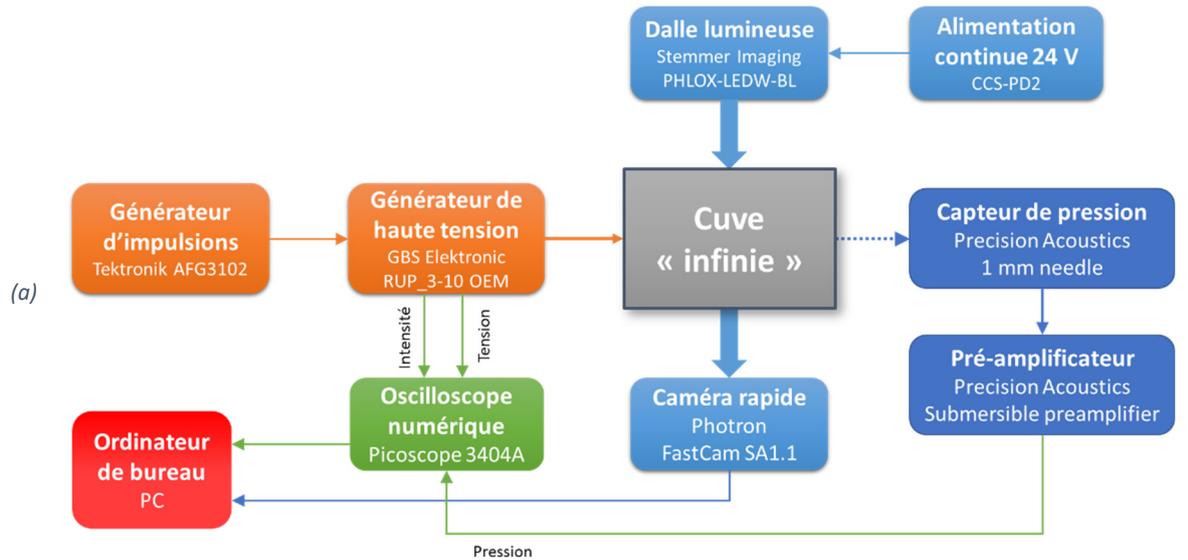


Figure 14 : Schéma (a) et photographie (b) du banc d'étude.

Le banc ainsi monté a permis d'étudier les phénomènes post décharge à proximité des électrodes à l'aide de visualisation et de mesures électriques.

3. Phénoménologie de la décharge électrique : formation d'un arc

Les résultats qui vont suivre sont obtenus en se plaçant dans des conditions où le claquage diélectrique est observé dans le liquide d'étude utilisé par Boussetta (2010) à savoir l'eau courante.

Pour cela, une différence de potentiel de 10 kV est imposée entre les électrodes de décharge sous forme d'une impulsion qui présente les caractéristiques suivantes :

- Un temps de montée très court (de l'ordre de 100 ns)
- Une largeur suffisante (ici l'impulsion a une largeur de 40 μ s)
- Une décharge lente avant claquage (cf. paragraphe 3.2.2)

Les conséquences observables d’une telle impulsion de tension sont enregistrées à l’aide de la caméra ultra-rapide. Elles peuvent être séparées en trois phases : une première phase de formation d’un arc électrique, une phase correspondant à la croissance et au collapsus d’une bulle de vapeur, et une dernière phase associée à la formation et la disparition successives de la bulle ; cette phase est appelée ici « rebonds de la bulle ».

3.1. Formation d’un arc électrique

Cette phase correspond aux premiers instants qui suivent l’application de la différence de potentiel entre les électrodes. La séquence d’images obtenue décrivant la formation d’un arc électrique est présentée en Figure 15. Pour observer les phénomènes qui s’y produisent, la caméra a été utilisée dans son mode le plus rapide ; l’enregistrement est effectué à 675 000 images par seconde.

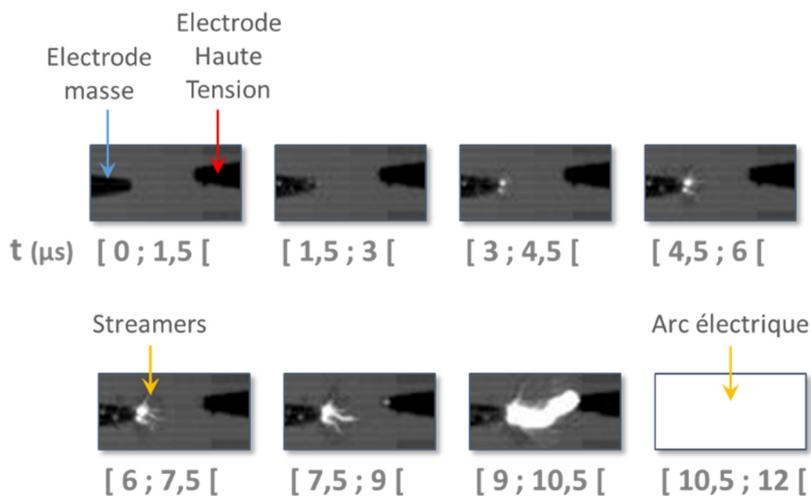


Figure 15 : Séquence enregistrée à 675 000 images/seconde pendant la formation de l’arc électrique dont l’apparition lors de la prise de la dernière image sature le capteur.

Cet arc électrique est l’aboutissement du développement de streamers au sein du liquide, comme présenté en section 1.1.2. Ces streamers sont visibles sous forme de branches lumineuses ramifiées. Ils partent principalement de l’électrode de masse et se déploient en direction de l’électrode portée à un potentiel élevé. Lorsque les streamers se rejoignent, ce qui est sur le point de se produire sur l’image associée à l’intervalle de temps [9 µs ; 10,5 µs [, l’arc électrique est formé. La très forte intensité lumineuse liée à la présence de cet arc sature le capteur de la caméra, qui enregistre alors une image blanche visible ici sur l’intervalle de temps [10,5 µs ; 12 µs [.

3.2. Etude du comportement électrique entre les électrodes

3.2.1. Application de la loi des mailles dans le circuit

Lorsque l’interrupteur est fermé, il est possible de ne considérer que la partie droite du circuit électrique présentée en Figure 12 et d’écrire la loi des mailles suivante :

$$U_c + U_{Rprotection} + U_{Rcuve} = 0 \quad (2.1)$$

Chapitre 2 – Production d’ondes électrohydrauliques

où U_c ; $U_{Rprotection}$ et U_{Rcuve} représentent les tensions aux bornes respectives du condensateur, de la résistance de protection et des électrodes de décharge dans la cuve.

La tension U_c est associée à la charge stockée dans le condensateur par la relation :

$$C \times U_c(t) = q(t) \quad (2.2)$$

C représentant la capacité du condensateur et $q(t)$ la quantité de charges contenues à l’instant t .

La variation de cette charge se traduisant par le courant i dans le circuit, on peut écrire :

$$i(t) = \frac{dq(t)}{dt} \quad (2.3)$$

En appliquant la loi d’Ohm il vient à l’aide des relations 2.1, 2.2 et 2.3 :

$$q(t) + (R_{protection} + R_{cuve}(t)) \times C \times \frac{dq(t)}{dt} = 0 \quad (2.4)$$

L’évolution temporelle de la résistance entre les électrodes R_{cuve} que l’on admettra constante par morceaux va permettre de séparer la décharge en 4 phases. Dans chacune de ces phases k il est possible de donner l’expression de l’intensité du courant :

$$i_k(t) = A_k \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right) \quad (2.5)$$

avec $\tau_k = (R_{protection} + R_{cuve,k}) \times C$

3.2.2. Présentation de la décharge en quatre phases

Une impulsion de tension de 10 kV d’amplitude conduit typiquement aux courbes courant-tension présentées sur le graphique en Figure 16.

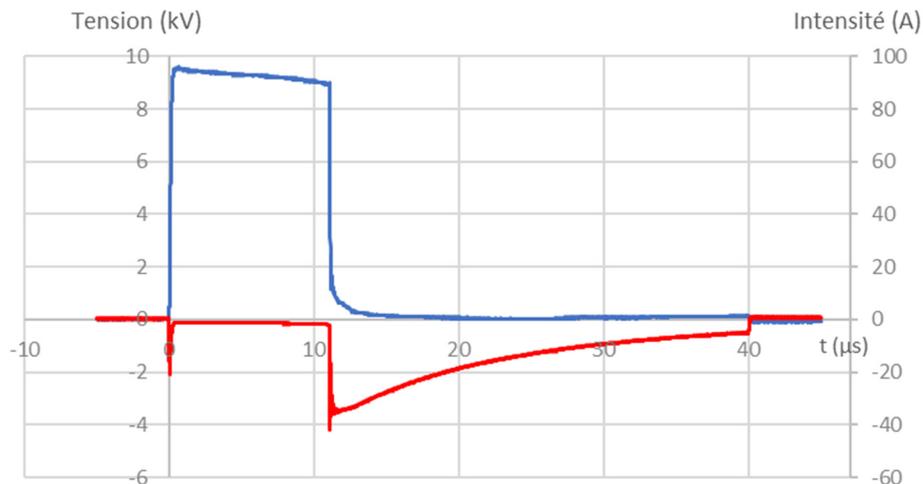


Figure 16 : Exemple de courbes courant-tension au niveau de la cuve. La courbe rouge représente l'intensité du courant (en valeurs négatives) et la courbe bleue donne l'évolution de la tension

Au regard de ces courbes, quatre phases peuvent être distinguées :

- **1^{ère} phase : électrolyse de l’eau**

Au cours de cette phase, un faible courant traverse la solution, qui se comporte en première approximation comme une résistance de valeur fixe, notée $R_{cuve,1}$ (cf. Figure 17).

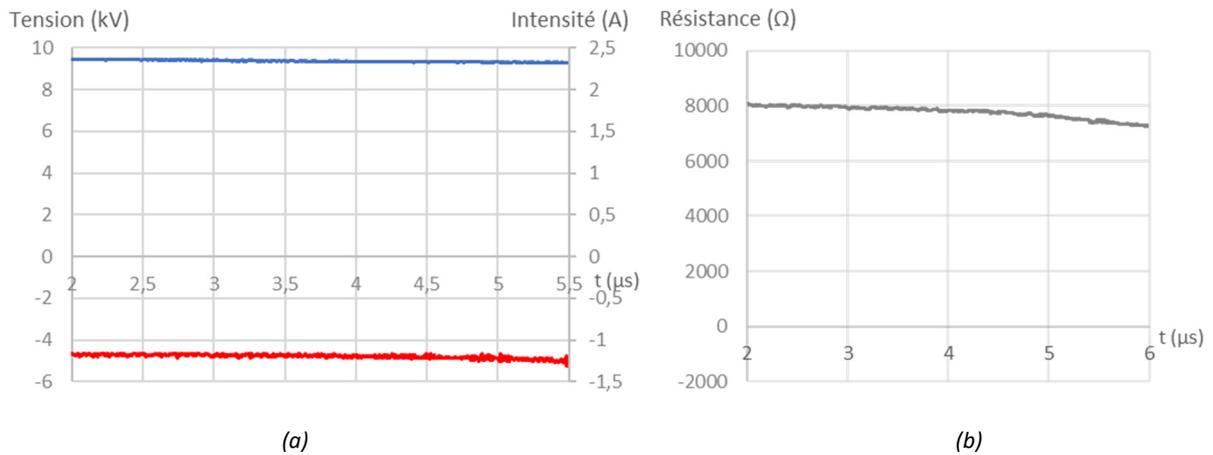


Figure 17 : Caractéristiques électriques lors de la 1^{ère} phase : (a) courbes courant-tension, (b) évolution de la résistance.

D’après la courbe expérimentale ci-dessus :

$$R_{cuve,1} = \frac{U_{moy}}{I_{moy}} = \frac{9,3 \text{ kV}}{1,2 \text{ A}} \approx 8000 \Omega \quad (2.6)$$

Cette valeur est en accord avec l’ordre de grandeur attendu en assimilant l’espace inter-électrode à un milieu résistif de conductivité 52 mS/m (cf. section 2.7). Au cours de cette phase de la décharge, l’énergie est donc en partie consommée par un phénomène d’électrolyse. La constante de temps de cette phase vaut :

$$\tau_1 = (R_{protection} + R_{cuve,1}) \times C = 0,36 \text{ ms} \quad (2.7)$$

Cette constante de temps très grande devant la durée de la phase considérée montre que l’énergie disponible dans le condensateur au terme de cet intervalle de temps est encore importante.

- **2^{ème} phase : développement des streamers**

L’intensité du courant augmente, tandis que la tension aux bornes des électrodes reste pratiquement constante (cf. Figure 18).

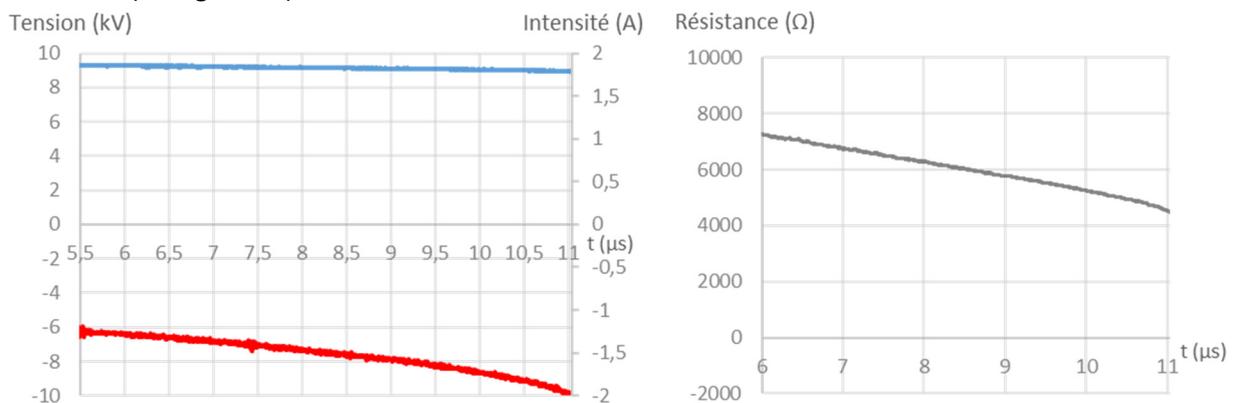


Figure 18 : Caractéristiques électriques lors de la 2^{ème} phase : (a) courbes courant-tension, (b) évolution de la résistance.

Au cours de cette phase la résistance du liquide diminue sans changer d’ordre de grandeur. Il s’agit de l’étape de développement des streamers.

- **3^{ème} phase : claquage diélectrique**

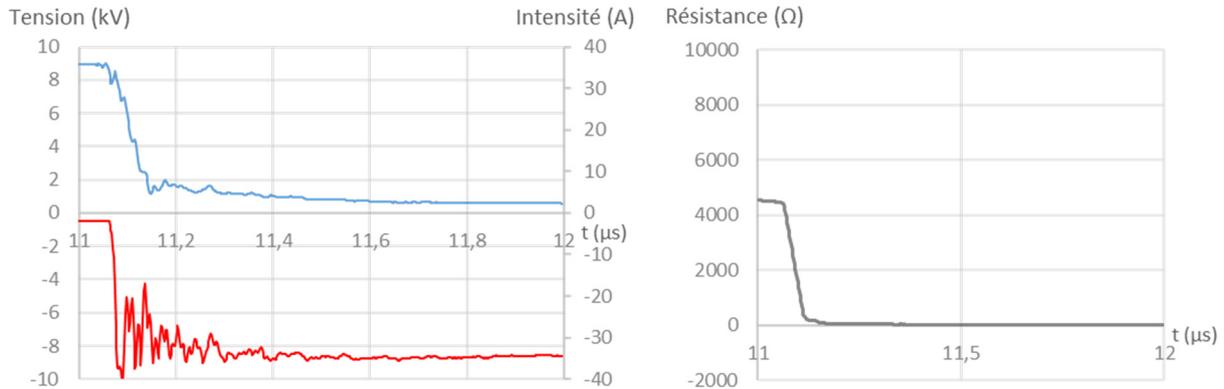


Figure 19 : Caractéristiques électriques lors de la 3^{ème} phase : (a) courbes courant-tension, (b) évolution de la résistance.

Lors de cette phase le liquide perd sa propriété diélectrique (cf. Figure 19). La valeur de la tension s’effondre, tandis que le courant atteint subitement des valeurs avoisinant les 40 A. La valeur de l’intensité est ici limitée par la résistance de protection qui impose, en cas de court-circuit, une valeur maximale du courant égale à $I_{max} = \frac{U}{R_{protection}} \approx 55 A$ sous 10 kV.

L’interprétation des oscillations du courant observées dans cette phase sont d’une grande complexité et ont fait l’objet de plusieurs études (Broyer, 1995; Ceccato, 2010).

- **4^{ème} phase : décharge de la capacité**

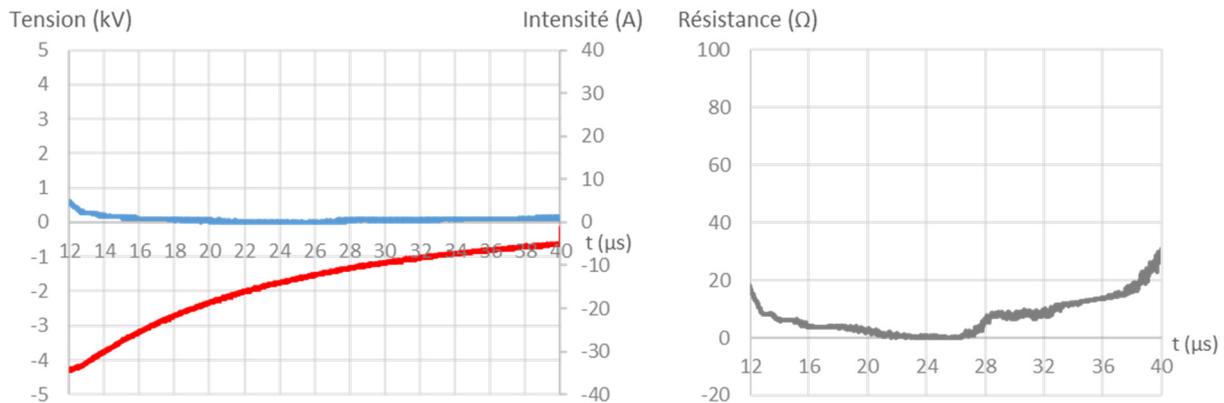


Figure 20 : Caractéristiques électriques lors de la 4^{ème} phase : (a) courbes courant-tension, (b) évolution de la résistance.

Dans cette phase l’espace inter-électrodes occupé par l’arc électrique présente une résistance quasi-nulle (cf. Figure 20). Les charges restantes dans la capacité sont libérées dans un circuit de faible résistance (il ne reste plus que la résistance de protection, la résistance de l’arc étant très faible) : la constante de temps liée à la décharge de la capacité C dans la résistance de protection vaut $\tau_4 \approx 8 \mu s$.

3.2.3. Bilan énergétique

Le bilan énergétique présenté dans ce paragraphe s’intéresse uniquement à l’énergie électrique injectée au niveau des électrodes de décharge placées dans la cuve. Un bilan énergétique plus complet, tenant compte des différentes façons dont cette énergie injectée est dépensée, est détaillé dans les premières pages du chapitre 3.

Au cours de la charge, le condensateur C stocke, dans le cas idéal, une énergie $W_{accumulée} = \frac{1}{2}CU^2$ où U représente la tension de charge du condensateur. L’énergie stockée par le condensateur chargé à 10 kV vaut donc $W_{accumulée} = 2,25 J$. Cette énergie est dépensée à la fois dans le circuit électrique de décharge (interrupteur à transistors haute tension et résistance de protection) et dans la cuve d’étude. D’après les données du constructeur fournies dans les spécifications de l’interrupteur à transistors, la consommation énergétique de cet élément peut être négligée devant celle des autres composants.

L’énergie dépensée dans la résistance de protection vaut $W_{protection} = R_{protection} \int I^2(t) dt$ d’après la loi d’Ohm. L’intensité du courant pouvant atteindre des valeurs de plusieurs ampères pendant quelques microsecondes au cours de la décharge, l’énergie dépensée par la résistance de protection peut représenter une part importante de l’énergie initialement disponible dans le condensateur.

Expérimentalement, il est possible de suivre en temps réel, avec un pas de temps de quelques nanosecondes, l’évolution des courbes courant-tension au niveau des électrodes de décharge dans la cuve. A partir de la définition intégrale $W_{cuve} = \int P(t)dt = \int U(t)I(t)dt$, on déduit de ces mesures l’énergie dépensée dans la cuve : environ **0,30 J par impulsion**.

4. Comportement hydraulique en milieu non confiné

4.1. Formation et effondrement (collapse) d’une bulle

L’élévation brutale de température de l’eau située à proximité de l’arc électrique, entraîne la formation d’une bulle de gaz entre les électrodes de décharge. Les mouvements de cette bulle sont suivis à l’aide de la caméra rapide. Une séquence type de telles images enregistrée à 100 000 images par seconde, entraînant une précision temporelle de 10 μs , est présentée en Figure 21.

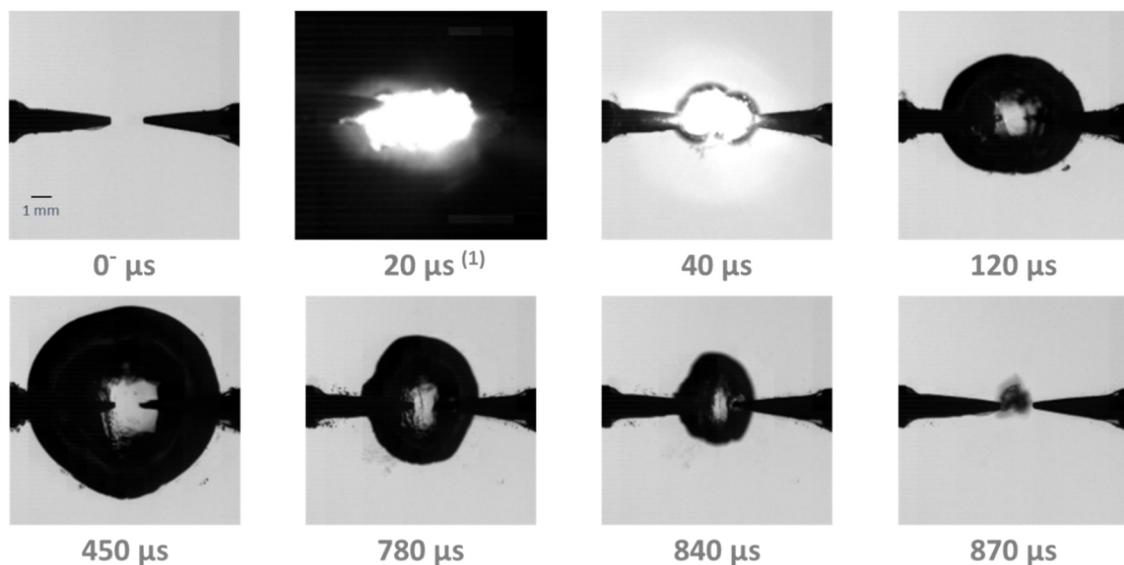


Figure 21 : Sélection d’images enregistrées à 100 000 images/seconde. Note : (1) provient d’un autre enregistrement dans des conditions similaires, avec un temps d’exposition (shutter) très court (1 μs) afin de visualiser l’arc électrique.

Sur cette séquence d’images, il est tout d’abord possible d’observer la présence de l’arc électrique entre les électrodes jusqu’au temps $t=40 \mu\text{s}$. L’élévation de température entraîne ensuite l’expansion d’une bulle, visible ici sur l’image prise au temps $t=120 \mu\text{s}$, jusqu’à atteindre son rayon maximal au temps $t=450 \mu\text{s}$. La phase de collapse, dont deux étapes peuvent être visualisées sur les images aux temps $t=780 \mu\text{s}$ et $t=840 \mu\text{s}$, démarre alors. Lorsque la bulle atteint sa taille minimale, ici à $t=870 \mu\text{s}$, on considère que le collapse est achevé.

4.2. Rebonds de la bulle

Au terme du collapse, une bulle peut réapparaître, collapser, puis se reformer ; ce cycle pouvant avoir lieu plusieurs fois de suite. Ce phénomène est visible sur la séquence présentée en Figure 22 à l’instant $t=900 \mu\text{s}$. Ce volume de gaz va atteindre une taille maximale à $t=1070 \mu\text{s}$ puis diminuer progressivement jusqu’à un minimum observé à $t=1270 \mu\text{s}$. Ce phénomène de croissance puis d’effondrement d’un volume de gaz se répète plusieurs fois sur la séquence d’images entre les temps $t=1270 \mu\text{s}$ et $1860 \mu\text{s}$, avec des amplitudes de plus en plus faibles.

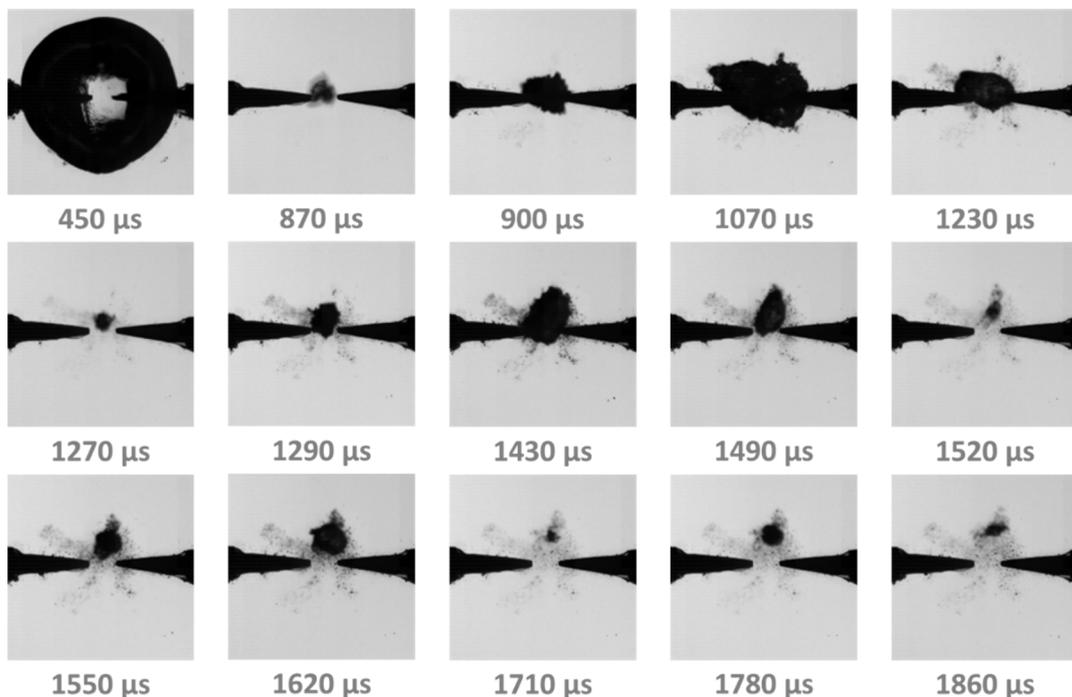


Figure 22 : Sélection d’images enregistrées à 100 000 images/seconde succédant aux images présentées en Figure 21.

4.3. Evolution des paramètres de la bulle

En assimilant la bulle à un ellipsoïde de révolution, il est possible de suivre l’évolution des paramètres de la bulle au cours du temps à partir des images de la caméra rapide à l’aide d’un logiciel de traitement d’image, ici ImageJ. Le volume est estimé à partir de la largeur w et de la hauteur h mesurées sur l’image en appliquant la formule :

$$V = \frac{4}{3}\pi \times \frac{w}{2} \times \frac{h^2}{4} \quad (2.8)$$

La courbe d’évolution du volume ainsi obtenue est présentée sur la Figure 23.

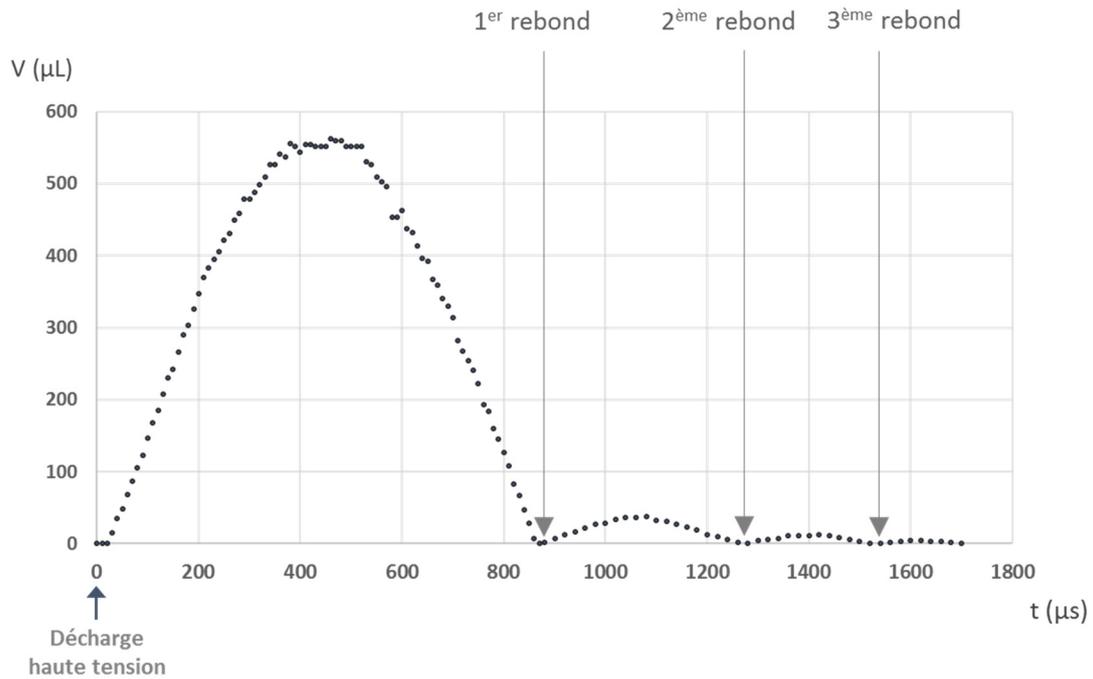


Figure 23 : Evolution du volume de la bulle et ses différents « rebonds » après la décharge haute tension.

De la même manière, il est possible de tracer les vitesses instantanées d’évolution de la bulle selon les deux directions mesurées. Ces vitesses sont tracées sur le graphique en Figure 24 ; dw/dt représente la vitesse d’évolution de la bulle selon un axe horizontal et dh/dt représente la vitesse d’évolution selon un axe vertical. Ces vitesses sont données pour la première bulle formée suite à l’expansion du plasma ainsi que pour les trois premières bulles formées suite aux rebonds successifs.

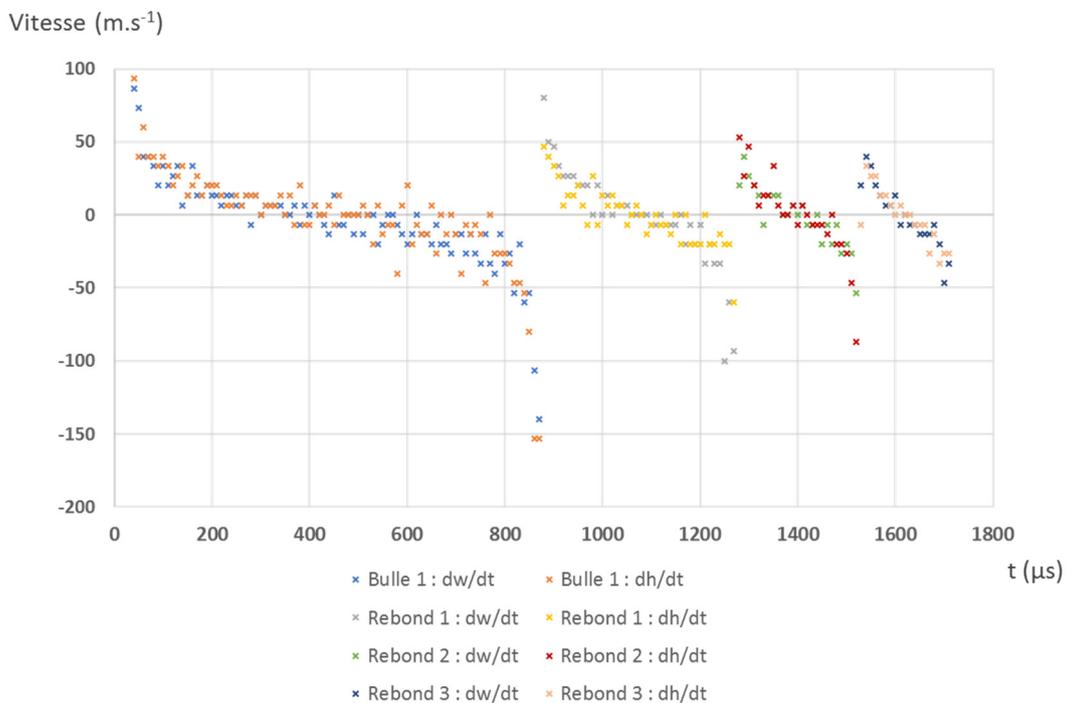


Figure 24 : Vitesses instantanées d'évolution de la taille de la bulle selon les directions horizontale (dw/dt) et verticale (dh/dt).

Chapitre 2 – Production d’ondes électrohydrauliques

En fait l’assimilation de la bulle à un ellipsoïde de révolution paraît d’une rigueur excessive pour deux raisons :

- D’une part cet ellipsoïde est proche d’une sphère (h voisin de w sur l’ensemble des points de mesure à partir de $t > 40 \mu\text{s}$)
- D’autre part les vitesses d’évolution de ces paramètres (dh/dt et dw/dt) sont extrêmement proches comme le montre le graphique 24.

Pour la suite de cette étude nous assimilerons donc la bulle à une sphère de rayon r . Ainsi le graphique obtenu en Figure 25 présente la vitesse d’évolution calculée à partir des points de mesure du rayon de cette bulle sphérique :

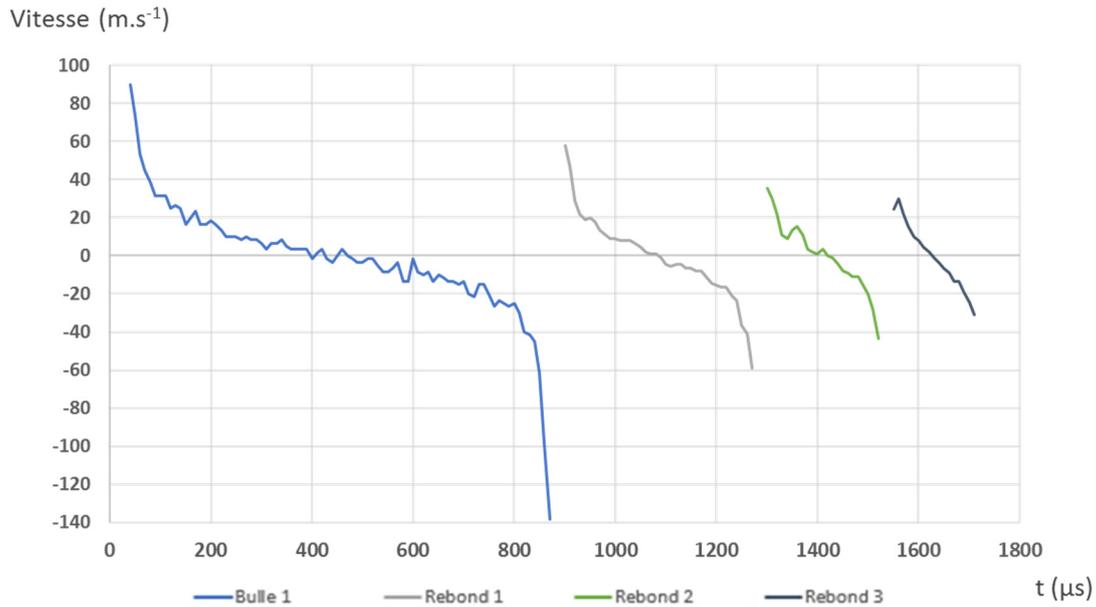


Figure 25 : Evolution de la vitesse de croissance et de collapse de la bulle principale et de ses rebonds successifs.

Ce graphique révèle l’importance des vitesses dans les premiers instants des phases de croissance et dans les derniers instants des phases de collapse. Il est particulièrement intéressant pour la suite de noter l’augmentation (en valeur relative) singulière de la vitesse au terme du collapse.

4.4. Observation des ondes dans la cuve

Un hydrophone en aiguille a été positionné à 7 cm du foyer des électrodes dans la « cuve infinie » pour suivre l’évolution dans l’eau des variations de pression provoquées par la décharge électrique, la formation et l’implosion de la bulle de gaz. Simultanément des images ont été enregistrées au moyen d’une caméra rapide. Les résultats sont consignés dans le graphique présenté en Figure 26.

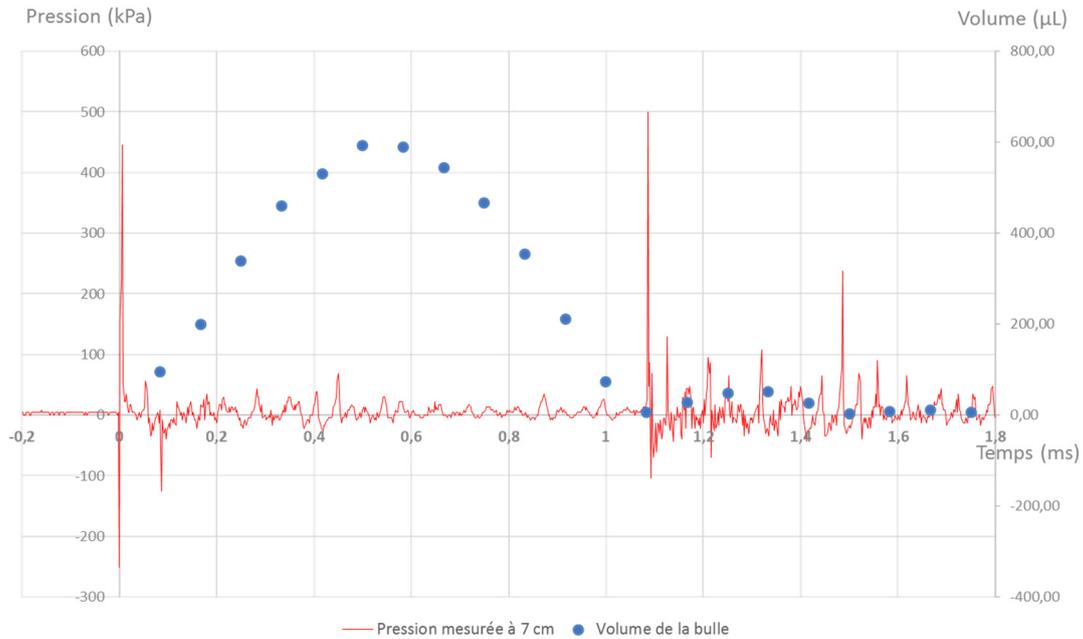


Figure 26 : Courbe de pression mesurée par l'hydrophone placé à 7 cm du foyer des électrodes. Des points présentant l'évolution du volume de la bulle de gaz sont superposés.

La courbe de pression superposée à la courbe d'évolution du volume de la bulle permet de mettre en évidence les instants de production des ondes de pression. Deux pics principaux sont à remarquer, le premier correspond au moment d'apparition de l'arc électrique ($t \approx 0$), le deuxième apparaît à la fin du collapse de la bulle ($t \approx 1080 \mu s$), juste avant son premier rebond. Un troisième pic est également visible à l'instant $t \approx 1500 \mu s$ à la fin du collapse du volume de gaz issu du premier rebond.

L'amplitude du pic de pression mesuré à la fin du collapse de la première bulle est plus importante que l'amplitude du pic associé à l'apparition de l'arc électrique. Ce résultat est fréquemment observé dans des expériences similaires (Li, et col., 2011). Pour les trois pics principaux les amplitudes enregistrées à 7 cm sont par ordre décroissant de 500 kPa, 445 kPa et 240 kPa.

Considérant une onde sphérique, l'amplitude du pic de pression subit une atténuation en $1/r$ (Smith, 2010). Dans le cadre de cette hypothèse et à partir des mesures effectuées, la pression à 1 mm du foyer des électrodes doit être d'environ 35 MPa. Notons tout de même que ce calcul est effectué à partir de l'équation de propagation linéarisée et en considérant que l'onde de pression ne cède pas d'énergie au milieu au cours de son déplacement dans le liquide

4.5. Aperçu sur la modélisation des phénomènes électrohydrodynamiques entre les électrodes

4.5.1. Formation d'un plasma

La configuration des électrodes et les caractéristiques de l'impulsion électrique permettent de se placer dans le cadre de la formation d'un plasma entre les électrodes représenté sur le schéma en Figure 27.

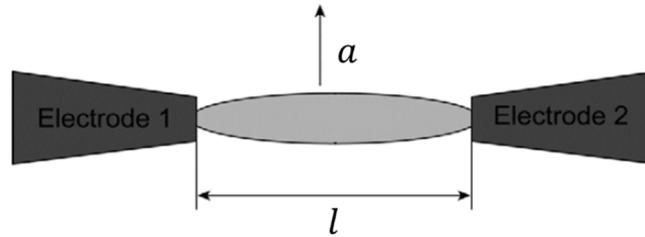


Figure 27 : Premiers instants du canal de plasma formé entre les électrodes (Cho & Fridman, 2012).

Ce plasma formé lors de la décharge haute tension est caractérisé par une température très importante, pouvant dépasser les 10000 K (Lei, et col., 2011), et une pression interne très élevée, de l’ordre du GPa (Timoshkin & MacGregor, 2008). A priori ce plasma s’étend entre les deux électrodes sous forme d’un fuseau dont la vitesse d’expansion selon l’axe perpendiculaire à celui des électrodes est très grande (Cho & Fridman, 2012). Certains auteurs assimilent ce plasma à un cylindre. C’est par exemple le cas du modèle présenté par Lee et col. (2015) que nous nous proposons d’étudier dans la suite de ce paragraphe.

Le canal de plasma est assimilé à un canal cylindrique droit, dont l’expansion est uniquement radiale. Les paramètres de ce cylindre, dépendant du temps, sont notés $a(t)$ son rayon et $A(t)$ sa section transversale. L’énergie électrique délivrée au canal de décharge par effet Joule est la somme de l’augmentation d’énergie interne du canal de décharge et du travail effectué par l’eau qui l’entoure. A partir des travaux de Timoshkin et col. (2006), l’équation de bilan de puissance peut s’écrire :

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{p}{\gamma - 1} A \right) + p \frac{dA}{dt} = \frac{P(t)}{l} \quad (2.9)$$

où p représente la pression dans le canal de décharge, l la longueur du canal, $P(t)$ la puissance délivrée au canal et γ le rapport des chaleurs spécifiques. Dans ce modèle, γ est supposé constant et égal à 1,3. Toutes les pertes sont négligées car l’échelle de temps considérée est plus petite que les temps caractéristiques de pertes par radiation ou par conduction. En introduisant les termes $V_r(t)$ et $i(t)$, respectivement la tension de résistance aux bornes du canal et le courant à travers le canal, la puissance $P(t)$ peut être remplacée par le produit $V_r(t) \times i(t)$.

L’approximation de Braginskii (détaillée dans Warne et col., 2005) permet d’écrire une relation relativement simple entre la pression de choc et l’évolution du canal :

$$p = K_p \rho_0 \left(\frac{da}{dt} \right)^2 \quad (2.10)$$

c’est-à-dire en utilisant la section transversale $A(t)$:

$$p = K_p \rho_0 \frac{1}{4\pi A} \left(\frac{dA}{dt} \right)^2 \quad (2.11)$$

où ρ_0 est la masse volumique de l’eau à température ambiante et K_p un coefficient de proportionnalité supposé ici égal à 2.

En combinant les équations 2.9 et 2.11, il vient l’équation de bilan de puissance suivante :

$$\frac{K_p \rho_0}{2\pi(\gamma - 1)} \frac{dA}{dt} \frac{d^2 A}{dt^2} + \frac{K_p \rho_0}{4\pi A} \left(\frac{dA}{dt} \right)^3 = \frac{V_r(t) i(t)}{l} \quad (2.12)$$

L’énergie électrique injectée lors de la formation du plasma est donc répartie d’une part en une augmentation de l’énergie interne du mélange plasma-vapeur au sein du canal, cette énergie résultant elle-même des processus de chauffage, de dissociation de molécules d’eau et d’ionisation et d’autre part en un travail mécanique d’expansion radiale du canal. Le déplacement brutal de cette frontière, qui est assimilable à une interface plasma-liquide, induit une onde de choc. En effet immédiatement après le début de la décharge, cette interface subit une phase d’accélération pendant laquelle $\frac{d^2A}{dt^2}$ est positive jusqu’à ce que la vitesse du rayon du canal $\frac{da}{dt}$ et la pression à l’intérieur du canal atteignent leurs valeurs maximales. Pendant cette phase la surface se comporte comme un piston qui induit dans le liquide qu’il déplace une accumulation d’ondes de compression et in fine une onde de choc avec une augmentation de la pression liquide au voisinage de l’interface.

A la fin de cette injection d’énergie par effet Joule, le canal occupe un volume $V_1 = \pi l a_1^2$ où l est la distance interélectrode et a_1 le rayon du canal de plasma avant son développement en une sphère de rayon $R_1 = \left(\frac{3l}{4a_1}\right)^{1/3} a_1$. Les valeurs du rayon R_1 , de la pression P_1 et de la vitesse \dot{R}_1 peuvent être déduites du modèle présenté ci-dessus. Notons que le pic de pression est atteint lors de l’émission de l’onde de choc. La pression à l’intérieur du plasma chute ensuite mais reste au-dessus de la pression du liquide environnant. Leur différence à l’interface est toutefois suffisamment faible pour supposer le liquide incompressible par la suite. De même la température θ_1 peut être estimée à partir de la loi des gaz parfaits qui nécessite de connaître la nature et le nombre de moles des gaz formés. Sur ce dernier sujet, l’estimation du détail des phénomènes physiques en jeu est largement en dehors de notre propos.

4.5.2. Modèle classique d’évolution du rayon de la bulle

Au terme de la phase précédente, correspondant au dépôt d’énergie en présence de l’arc électrique, une bulle de gaz approximativement sphérique est formée. Notons que dans ces travaux de thèse, l’étape préliminaire à la formation de cette bulle de gaz n’a pas été observée. Le point de départ de notre étude est donc une bulle approximativement sphérique dont la pression interne est élevée devant la pression atmosphérique.

La pression élevée à l’intérieur de cette bulle va conduire à une évolution de son rayon. L’énergie interne de la bulle est alors convertie en énergie cinétique qui permet le déplacement de l’interface gaz/liquide vers l’extérieur. Cette phase correspond à l’expansion de la bulle.

L’inertie des éléments de volume situés à proximité de l’interface en mouvement entraîne ensuite l’expansion de cette bulle dans une situation telle que la pression interne de la bulle chute très en dessous de la pression hydrostatique. La bulle s’effondre alors violemment.

Le collapse brutal de la bulle de vapeur conduit de la même façon, en raison de l’inertie des éléments de volume situés à proximité de l’interface, à une situation dans laquelle la pression intérieure de la bulle est très grande devant la pression hydrostatique. Ces cycles de croissance/collapse de la bulle peuvent avoir lieu plusieurs fois.

4.5.2.1. Équation d’évolution du rayon de la bulle

Nous proposons dans ce paragraphe de mettre en équation l’évolution du rayon de la bulle en tenant compte de certaines approximations que nous justifierons progressivement. Cette équation est obtenue en coordonnées sphériques en prenant pour origine le centre de la bulle.

Chapitre 2 – Production d’ondes électrohydrauliques

L’équation de conservation de la masse dans le liquide s’écrit (Bergles et col., 1981) :

$$\frac{\partial \rho_L}{\partial t} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (\rho_L r^2 w_L) = 0 \quad (2.13)$$

où w_L est la vitesse radiale dans le liquide, ρ_L la masse volumique du liquide et r supérieur au rayon de la bulle.

En considérant que le liquide est incompressible, hypothèse que nous considérons vraie après l’émission de l’onde de choc, l’équation 2.13 s’écrit :

$$\frac{\partial (r^2 w_L)}{\partial r} = 0 \quad (2.14)$$

L’équation de conservation de la masse dans le liquide peut alors s’intégrer simplement :

$$w_L = \frac{A(t)}{r^2} \quad (2.15)$$

L’équation de la conservation de la quantité de mouvement dans le liquide s’écrit :

$$\rho_L \left(\frac{\partial w_L}{\partial t} + w_L \frac{\partial w_L}{\partial r} \right) = - \frac{\partial p_L}{\partial r} + \frac{4}{3} \mu_L \left(\frac{\partial^2 w_L}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial w_L}{\partial r} - \frac{2w_L}{r^2} \right) \quad (2.16)$$

où p_L est la pression dans le liquide et μ_L la viscosité dynamique du liquide.

En combinant les équations 2.15 et 2.16 il vient :

$$\rho_L \left(\frac{\partial w_L}{\partial t} + w_L \frac{\partial w_L}{\partial r} \right) = - \frac{\partial p_L}{\partial r} \quad (2.17)$$

Au cours de l’évolution de la bulle, on considère qu’il n’y a pas de phénomène de vaporisation, donc qu’il n’y a pas de flux de masse à travers l’interface. Cela permet d’écrire :

$$w_{Li} = \dot{R} \quad (2.18)$$

Ainsi, en introduisant l’équation 2.18 dans l’expression 2.17, il vient en intégrant de R à l’infini :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{p_{Li} - p_{L\infty}}{\rho_L} \quad (2.19)$$

où p_{Li} représente la pression du liquide au niveau de l’interface et $p_{L\infty}$ représente la pression hydrostatique.

Cette équation porte le nom d’équation de Rayleigh et tient compte des approximations suivantes :

- il n’y a pas de transfert de masse au niveau de l’interface,
- le liquide est incompressible.

L’équation de conservation de la quantité de mouvement à l’interface s’écrit alors :

$$p_{Gi} - p_{Li} = \frac{2\sigma}{R} + \frac{4}{3}\mu_G \left(\frac{\partial w_G}{\partial r} \Big|_i - \frac{w_{Gi}}{R} \right) - \frac{4}{3}\mu_L \left(\frac{\partial w_L}{\partial r} \Big|_i - \frac{w_{Li}}{R} \right) \quad (2.20)$$

Afin de trouver une expression simple de la pression du liquide à l’interface, nous simplifions l’équation 2.15 en considérant que :

- la pression de Laplace est négligeable aux dimensions considérées
- les forces de viscosité sont négligeables dans la vapeur comme dans le liquide

Il en résulte :

$$p_{Gi} = p_{Li} \quad (2.21)$$

Dans un premier temps nous considérons ici qu’un modèle adiabatique suffit à décrire convenable le gaz contenu dans la bulle. Cela permet d’écrire qu’en tout point du volume de la bulle :

$$p_G V_G^\gamma = \text{constante} \quad (2.22)$$

où V_G est le volume de la bulle de gaz, γ le coefficient adiabatique de ce gaz et $p_G = p_{Gi}$ la pression supposée homogène à l’intérieur de la bulle. Ce modèle est par la suite discuté en annexe de ce chapitre, mais il est pour l’instant retenu en raison de sa grande simplicité.

La bulle de gaz étant assimilée à une sphère de rayon R à partir de 2.20 nous pouvons alors écrire :

$$p_G = P_1 \left(\frac{R_1}{R} \right)^{3\gamma} \quad (2.23)$$

où p_1 et R_1 représentent respectivement la pression initiale et le rayon initial de la bulle (cf. paragraphe 4.5.1).

A partir de l’équation 2.19, il est alors possible de décrire l’évolution du rayon R en tenant compte des approximations précédentes :

$$\ddot{R} = \frac{1}{R} \left\{ \frac{P_1}{\rho_L} \left(\frac{R_1}{R} \right)^{3\gamma} - \frac{3}{2} \dot{R}^2 - \frac{P_{L\infty}}{\rho_L} \right\} \quad (2.24)$$

4.5.2.2. Confrontation partielle à l’expérience

Nous proposons dans ce paragraphe une confrontation du modèle précédemment établi à une série de mesures expérimentales. Cette confrontation se limite à l’évolution de la bulle de gaz formée après l’extinction de l’arc électrique.

Une solution de l’équation différentielle 2.24 a été obtenue à l’aide du logiciel Matlab. L’exploitation du modèle de plasma présenté précédemment permettant a priori de coupler l’évolution du plasma avec celle de la bulle de vapeur est assez délicate et demanderait de déterminer certains paramètres C’est la raison pour laquelle les conditions initiales utilisées dans la simulation sont extraites directement expérimentales. Le rayon initial de la bulle de vapeur a ainsi été fixé à 1 mm (correspondant à l’écartement des électrodes) et sa vitesse d’expansion initiale retenue est 45 m.s⁻¹. La pression $p_{L\infty}$ a été estimée à 100 kPa.

La pression initiale p_1 à l’intérieur de la bulle n’ayant pas pu être mesurée, elle a été choisie de façon à se rapprocher au plus possible de la courbe expérimentale, obtenue dans la cuve infinie avec une décharge de 40 μ s.

Le graphique en Figure 28 présente les deux courbes obtenues (expérimentale et simulée). Un bon accord entre ces deux courbes est trouvé. Le modèle de Rayleigh semble donc pouvoir s’appliquer à notre cas. En outre une estimation de la pression initiale de la bulle, suite à la disparition du plasma, a pu être obtenue.

5.1.1. De la « cuve infinie » à un espace confiné

Dans un premier temps, des parois de la cuve infinie sont rapprochées dans la direction orthogonale aux baguettes jouant le rôle d’électrodes de décharge. Afin d’avoir une vision de l’évolution du rayon de la bulle dans la direction concernée par le rapprochement des parois, les acquisitions vidéo sont effectuées selon la 3^{ème} direction, c’est-à-dire selon l’axe vertical à l’aide d’un miroir placé au-dessus de la cuve. Les parois mouvantes espacées entre elles d’une distance d sont chacune placée à égale distance des électrodes. Les images issues de cette étude sont présentées en Figure 31.

	$t = 80 \mu\text{s}$: croissance	$t \approx 380 \mu\text{s}$: taille maximale	$t \approx 550 \mu\text{s}$: collapse
$d = \infty$			
$d = 2 \text{ cm}$			
$d = 1 \text{ cm}$			
$d = 0,6 \text{ cm}$			
$d = 0,5 \text{ cm}$			

Figure 31 : Séquence d’images obtenues pour différentes valeurs de l’espacement noté d entre la paroi mouvante et le foyer des électrodes.

Les parois modifient de façon perceptible le comportement de la bulle lorsqu’elles sont placées à moins de 1 cm du foyer des électrodes. Le développement d’une bulle sphérique est limité par la présence des parois qui ont tendance à aplanir la bulle qui s’étire alors dans la direction des électrodes. L’effet est plus marqué dans la phase de croissance de la bulle.

5.1.2. Rapprochement de la surface libre vers le foyer des électrodes

Dans cette partie, l’influence de la surface libre (interface eau/air à pression atmosphérique) est étudiée. La hauteur d’eau h par rapport au niveau des électrodes (cf. Figure 30) est réduite et le comportement de la bulle est enregistré à 9 000 images par seconde. Des séquences obtenues pour trois hauteurs d’eau différentes sont présentées en Figure 32.

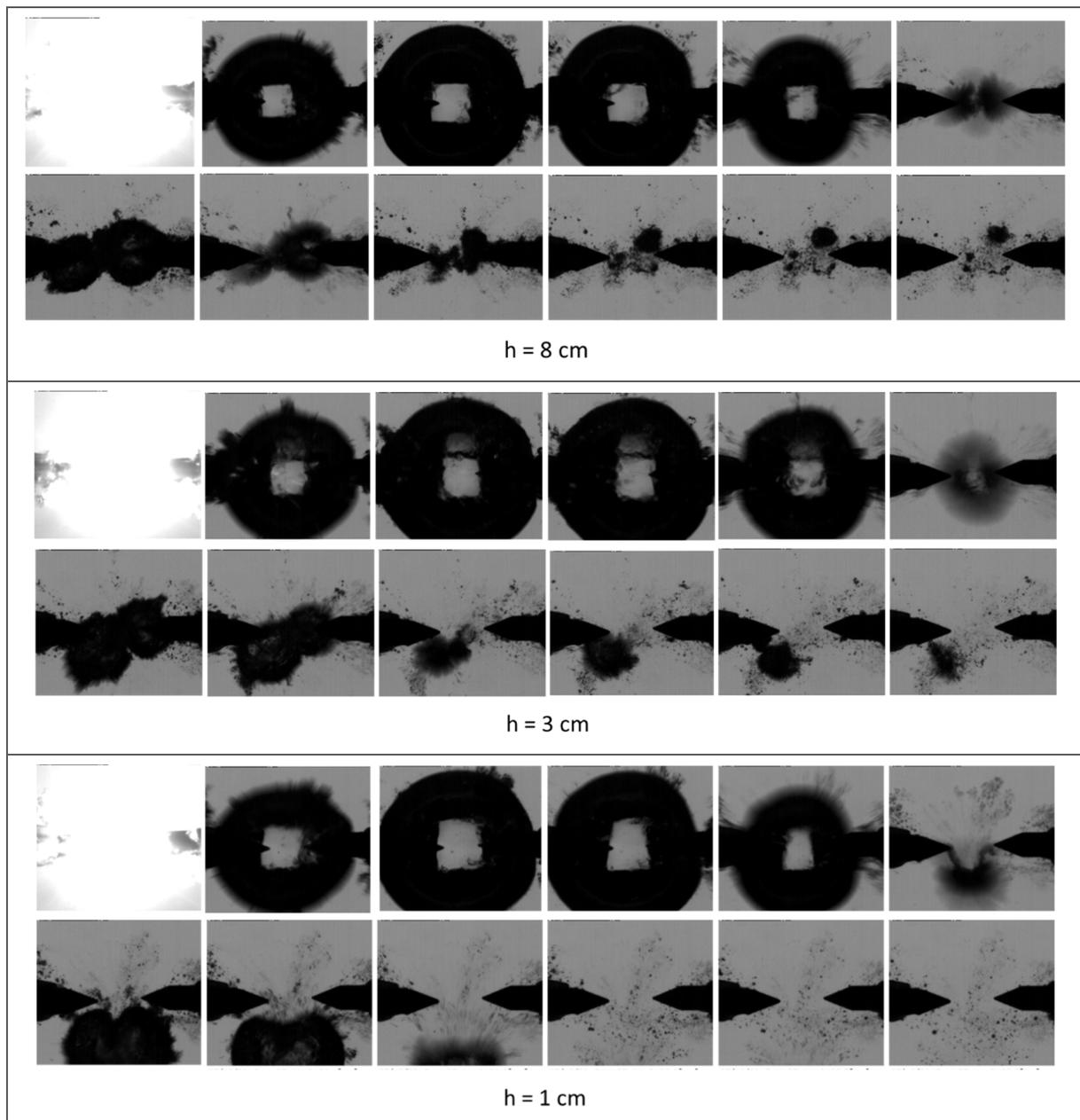


Figure 32 : Séquence d'images présentées à 9 000 images/seconde pour différentes hauteurs d'eau.

Sur ces séquences d’images, une influence de la surface libre sur le mouvement de la bulle peut être observée : plus la surface libre est proche des électrodes, plus le collapse de la bulle est translaté vers le fond de la cuve. En revanche le développement de la bulle et son volume maximal, visible sur la 4^{ème} image de chaque séquence, ne semblent pas affectés.

5.2. Etude dans la cuve en U

5.2.1. Justification de la géométrie

Cette cuve de géométrie très simple permet d’accroître le confinement par rapport aux dispositifs précédents. Elle permet de traiter des volumes de l’ordre de la centaine de microlitres, et se trouve ainsi plus appropriée au traitement de microorganismes (cf. chapitres 4 et 5).

La forme en U de la cuve a en outre été choisie dans la perspective de concevoir un système final dans lequel les ondes de choc seront focalisées. Ce type de système est assez classique dans la littérature, notamment dans le cas des générateurs électrohydrauliques utilisés en lithotritie (cf. les travaux de thèse de Broyer, 1995), ou plus généralement dans certaines publications expérimentales s’intéressant aux ondes de choc produites par des générateurs électrohydrauliques (Buogo & Cannelli, 2002), (Rassweiler et col., 2011), (Li et col., 2011). L’étape ultérieure consistant à utiliser un réflecteur d’ondes à l’aide d’un matériau solide de forme parabolique sera étudiée dans le chapitre 6. Cependant dans la suite du présent chapitre, les études sont menées dans la cuve en forme de U, plus simple à concevoir et à fabriquer, et proche du système final.

5.2.2. Premières observations

Deux cas limites peuvent être identifiés suite à une décharge haute tension entre les électrodes de la cuve :

- Dans un premier cas représenté en Figure 33 la cuve est entièrement remplie de liquide. Il est alors intéressant de noter que le développement de la bulle entre les électrodes est très limité et les rebonds successifs sont peu visibles. Avec un champ d’observation plus large que celui présenté, mais une vitesse d’enregistrement plus faible, il est possible de suivre l’interface eau/air qui adopte alors un mouvement de faible amplitude après la décharge haute tension et forme une pointe au centre de la cuve.

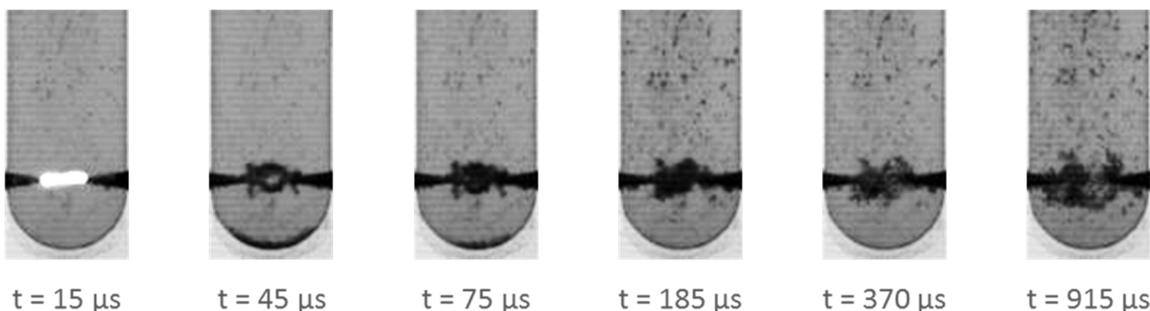


Figure 33 : Séquence enregistrée à 80000 images par seconde centrée sur les électrodes dans une cuve remplie entièrement d’eau.

- Lorsque la surface libre est à proximité des électrodes, la bulle se développe sous forme d’un ellipsoïde allongé selon la verticale, donnant lieu à un jet liquide marqué au niveau de la surface libre (cf. Figure 34). La bulle se développe dans la direction dans laquelle elle n’est pas

gênée par la présence de parois, c’est-à-dire vers la surface libre. Lors de la phase de collapse, un étranglement de la partie supérieure est observable.

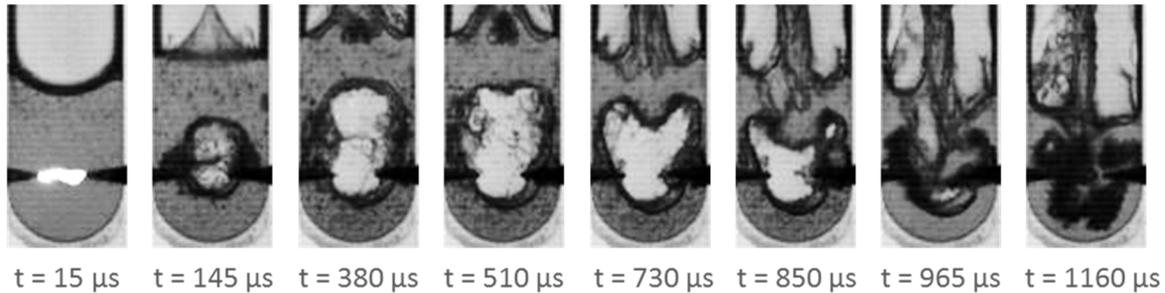


Figure 34 : Séquence enregistrée à 80000 images par seconde centrée sur les électrodes dans une cuve remplie de 120 μL d'eau. La position de l'interface eau/air est à 6 mm au-dessus des électrodes.

Entre ces deux cas « limites », il existe une zone de transition. Plus le volume d’eau dans la cuve est important, plus on se rapproche du premier cas : la bulle se forme de plus en plus difficilement et le jet au niveau de l’interface est de moins en moins marqué.

5.2.3. Apparition d’un nuage de cavitation

Un effet notable du confinement, manifeste lorsque le volume d’eau au-dessus des électrodes est important, est le développement de très nombreuses microbulles formant un « nuage de cavitation ». Cette expression fréquemment employée dans la littérature scientifique (Franc, 2006) désigne un nuage de microbulles formées suite au passage d’une dépression. Ce phénomène peut se reproduire plusieurs fois lorsque l’onde de pression se réfléchit sur la surface libre (Tomita, et col., 1991) ou dans le fond de la cuve.

Sur les images présentées en Figure 35, il est possible de voir l’apparition du nuage de cavitation très rapidement après la décharge haute tension (cf. l’image prise à $t=85 \mu\text{s}$). Suit alors une phase de « disparition » lente du nuage entre les temps $t=85 \mu\text{s}$ et $t=1475 \mu\text{s}$. Ce nuage de cavitation réapparaît ensuite et disparaît à nouveau plusieurs fois, en devenant de moins en moins visible sur les images de la caméra. Le nuage de cavitation est observable dans tout le volume de solution situé au-dessus des électrodes, quel que soit le niveau de remplissage de la cuve. Les collapses des différentes microbulles formant le nuage de cavitation produisent individuellement des ondes de choc (Brennen, 1995) pouvant avoir localement un effet lorsque la lyse sera recherchée.

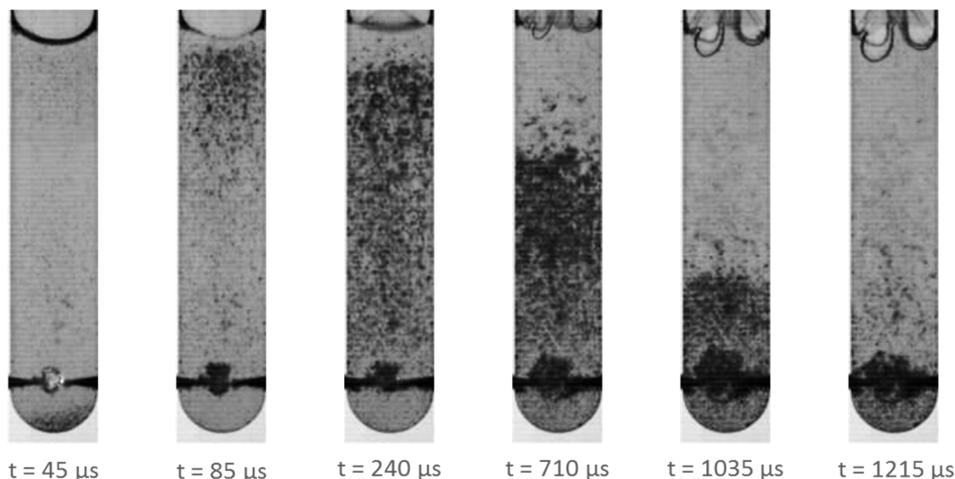


Figure 35 : Séquence d’images enregistrée à 80000 images par seconde dans une cuve remplie de 360 μL d'eau.

La dynamique du nuage de cavitation peut être mise en évidence en comparant les images successives de la séquence enregistrée. Ainsi en effectuant la soustraction d’une image par l’image précédente, il est possible de faire ressortir des perturbations créées par le passage de l’onde de choc. Les résultats de certaines de ces soustractions d’images successives sont présentés en Figure 36. Les images obtenues sont annotées avec une flèche indiquant la position du front d’onde lorsque celui-ci est visible et son sens de déplacement.

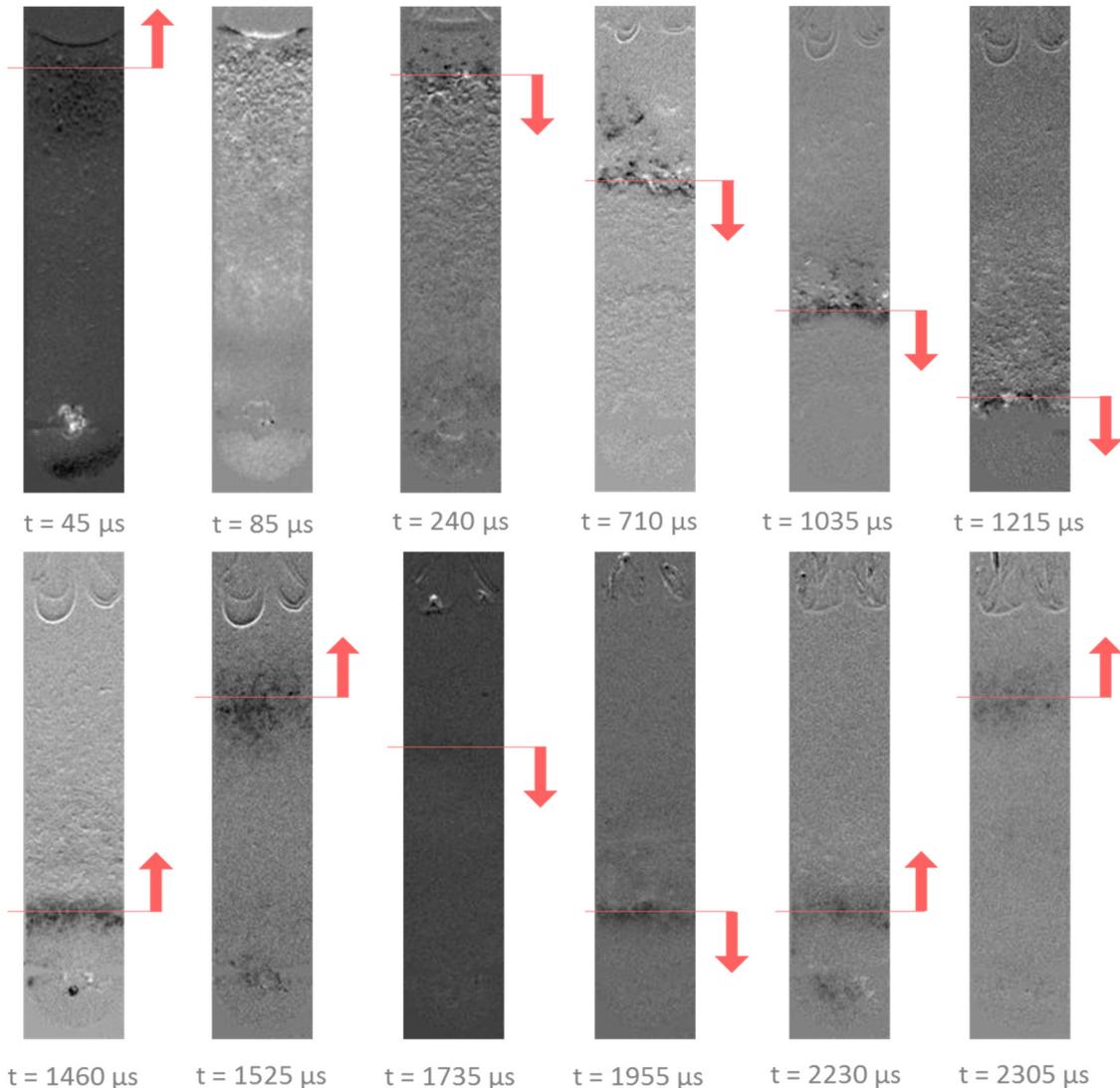


Figure 36 : Séquence d’images résultant de la soustraction 2 à 2 d’images consécutives issues d’une acquisition à 80000 images par seconde présentée en Figure 35. Lorsqu’un front d’onde est visible, il est marqué par un trait rouge accompagné d’une flèche indiquant son sens de propagation.

Plusieurs mouvements de fronts d’onde sont visibles successivement :

- Un front apparaît à la suite de la décharge et se propage vers la surface libre à une vitesse d’environ 1500 m.s^{-1}
- Ce front est réfléchi au niveau de la surface libre et revient vers le bas de la cuve à une vitesse d’environ 10 m.s^{-1} . Il est important de remarquer que le nuage de cavitation alors présent dans le volume d’eau situé au-dessus des électrodes ralentit significativement la propagation de l’onde de choc. Ce phénomène a été mis en évidence par Kieffer (1977).

- L’onde de pression est ensuite réfléchiée dans le fond de la cuve puis remonte à nouveau vers la surface libre à une vitesse intermédiaire d’environ 230 m.s^{-1} , liée à la présence persistante de microbulles dans le volume d’eau au-dessus des électrodes.

Cette séquence de réflexions au niveau de la surface libre et dans la fond de la cuve se reproduit plusieurs fois par la suite avec une amplitude de plus en plus faible.

Conclusion

Ce chapitre a permis de présenter de manière phénoménologique les conséquences d’une décharge haute tension dans l’eau courante grâce à des enregistrements vidéo ultra-rapides, des mesures de paramètres électriques et des mesures de pression.

Les expériences conduites en milieu non confiné ont permis d’observer des phénomènes électrohydrauliques bien connus produits par une décharge haute tension entre deux électrodes en pointe : lors du claquage diélectrique du liquide, après apparition et propagation de streamers, un arc électrique s’établit entre les électrodes de décharge. Cet arc électrique apporte la chaleur nécessaire à la formation d’une bulle de gaz qui, après une phase d’expansion, s’effondre brutalement. L’initiation de la phase de formation de la bulle, et la fin de la phase de collapse, entraînent la création d’ondes de choc d’amplitude de l’ordre de plusieurs dizaines de MPa à 1 mm du foyer des électrodes. Il est intéressant de noter que l’énergie dépensée par le générateur est assez faible, de l’ordre du Joule, en regard de certaines autres études (Locke, et col., 2006), mais elle suffit pour produire le claquage diélectrique de la solution et ses conséquences sur le plan hydraulique dans la configuration géométrique choisie pour les électrodes. Une étude plus approfondie des différents postes potentiels de dépense de l’énergie électrique fournie par le générateur est présentée dans le chapitre 3.

Dans la dernière partie de ce chapitre, les conditions aux limites ont été changées en rapprochant les parois solides et la surface libre à proximité du foyer des électrodes, à des distances de l’ordre du centimètre. Dans ces nouvelles conditions, l’apparition d’un arc électrique se produit à l’identique. En revanche, les phénomènes hydrauliques sont perturbés : la bulle de gaz entre les électrodes ne se développe plus selon une sphère d’environ 1 cm de diamètre, et plusieurs cas peuvent être observés selon la proximité des limites. En outre, lorsque les ondes de choc produites sont confinées dans un espace suffisamment petit (cf. cas de la cuve en U), il est possible d’observer le développement d’un nuage de microbulles de cavitation. Ces microbulles naissent du passage d’un front de pression négative sur des sites de nucléation, par exemple des microbulles présentes dans le liquide, des particules en suspension ou des défauts sur les parois de la cuve. Le développement et le déclin répétés de ce nuage de cavitation témoignent de réflexions du front de pression aux extrémités de la cuve.

Un aperçu des phénomènes hydrauliques liés à la décharge haute tension a été présenté dans ce chapitre. De nombreux autres phénomènes sont engendrés par la décharge, tels que des effets chimiques et thermique. Ces effets, d’une grande richesse, sont plus facilement quantifiables dans le milieu confiné qui est le cadre des applications visées dans cette thèse. Ils sont étudiés dans le chapitre suivant.

Annexe 1 : Quelques limites du modèle isentropique

Les écarts observés dans la figure (expé/simu) entre les courbes expérimentale et simulée sont dans l’expérience considérée assez faibles, mais obtenus au prix d’un déplacement du point origine théorique par rapport au point origine expérimental (fin de la période de formation du plasma). On pourrait viser d’une manière générale à un meilleur accord à condition, comme nous allons le montrer, de ne pas supposer sur toute l’évolution de la bulle (expansion suivie d’effondrement) un modèle du comportement du gaz résultant de l’hypothèse d’isentropie. Comme le modèle du liquide sera conservé, il ne sera pas ici rappelé ; ce dernier modèle classique pour un fluide incompressible ne justifie pas, à la différence du modèle du gaz qui va suivre, de justification dimensionnelle.

Rappelons l’ensemble des équations de bilan et des lois d’état et constitutive d’un gaz non condensable qui gouvernent, sans poser a priori l’hypothèse d’isentropie, les champs radiaux au sein de la bulle : masse volumique $\rho_G(r)$, vitesse $w_G(r)$, température $\theta_G(r)$ et pression $p_G(r)$, avec le rayon r variant de 0 à $R(t)$. On peut supposer que ce gaz est formé de molécules de H_2 et de O_2 résultant de la dissociation de l’eau.

Ce gaz est supposé idéal, ce qui permet d’écrire :

$$p_G(r) = \mathcal{R}\rho_G(r) \theta_G(r) \quad (A.1)$$

où $\mathcal{R} = \frac{R}{M}$ est la constante spécifique massique du gaz dans la bulle, avec M la masse molaire du gaz considéré et R la constante universelle des gaz parfaits.

A la suite des travaux de Schlichting (1979), on admettra que restent constants avec la température, la chaleur spécifique isobare Cp_g et le nombre de Prandtl $Pr_G = \frac{\nu_G}{\alpha_G}$; dans ce nombre nous retrouvons la viscosité cinématique $\nu_G = \frac{\mu_G}{\rho_G}$ où μ_G est la viscosité dynamique et la diffusité thermique $\alpha_G = \frac{\lambda_G}{\rho_G Cp_G}$ où λ_G est la conductibilité thermique.

Il est fréquent de supposer la loi suivante pour la viscosité (Schlichting, 1979) :

$$\mu_G(\theta_G) = \mu_1 \frac{\theta_G}{\theta_1} \quad (A.2)$$

où μ_1 est la valeur de la viscosité dynamique à la température θ_1 introduite dans la section 4.5.1 du présent chapitre.

On en déduit une loi pour la conductibilité thermique λ_G :

$$\lambda_G = \left(\frac{Cp_G \mu_1}{Pr_G \theta_1} \right) \theta_G \quad (A.3)$$

où l’expression dans la parenthèse est indépendante de la température.

A l’interface de la bulle on négligera les phénomènes de vaporisation et supposera de surcroît que la conductibilité du gaz est nettement inférieure à celle de l’eau. Ces deux hypothèses permettent de se passer du bilan de chaleur interfacial. Il ne reste donc à vérifier que l’égalité de température à l’interface :

$$(\theta_G - \theta_L)_{r=R(t)} = 0 \quad (A.4)$$

Chapitre 2 – Production d’ondes électrohydrauliques

Le liquide se comporte donc comme un thermostat à température constante et uniforme θ_L . Un autre avantage de ces hypothèses est qu’il devient inutile de rechercher le champ de température dans le liquide. Notons que les conclusions qui seront tirées de cette annexe sont indépendantes de ces hypothèses simplificatrices qui pourraient être omises dans une étude plus détaillée.

Le bilan interfacial de masse a déjà été utilisé dans le modèle classique où l’on a négligé une éventuelle vaporisation (cf. équation 2.18 dans la section 4.5.2) et sera conservé ici.

De même le bilan interfacial de quantité de mouvement a déjà été utilisé dans le modèle adiabatique précédent à cela près que la pression du gaz qui y figure est celle qui règne uniformément dans toute la bulle. Dans un premier temps nous supposons qu’il s’agit de la pression du gaz à l’interface.

Les conditions aux limites à introduire au centre de la bulle pour exprimer la symétrie sphérique du champ sont :

$$\begin{aligned} w_G|_{r=0} &= 0 \\ \left(\frac{\partial w_G}{\partial r} - \frac{w_G}{r}\right)_{r=0} &= 0 \\ \frac{\partial \theta_G}{\partial r}\bigg|_{r=0} &= 0 \\ \frac{\partial \rho_G}{\partial r}\bigg|_{r=0} &= 0 \end{aligned} \tag{A.5}$$

Les conditions initiales pour la pression, la masse volumique et la température, supposées uniformes, sont égales respectivement à p_1 , ρ_1 et θ_1 comme mentionné dans la section 4.5.1. De même le rayon initial et sa vitesse initiale sont égaux à R_1 et \dot{R}_1 respectivement.

Les différentes variables adimensionnelles s’écrivent donc :

$$\begin{aligned} \rho_G^* &= \frac{\rho_G}{\rho_1} \\ \theta_G^* &= \frac{\theta_G}{\theta_1} \\ p_G^* &= \frac{p_G}{p_1} \\ w_G^* &= \frac{w_G}{\dot{R}_1} \\ r^* &= \frac{r}{R_1} \\ t^* &= \frac{t}{T} \end{aligned} \tag{A.6}$$

où $T = \frac{R_1}{\dot{R}_1}$ est une échelle de temps convective déjà choisie implicitement dans le modèle classique puisque les deux premiers termes de l’équation 2.16 ont été supposés du même ordre de grandeur.

Le système d’équations pour le gaz dont on peut trouver l’établissement dans Bird et col. (2002) s’écrivent sous une forme adimensionnelle adaptée à notre étude.

Bilan de masse :

$$\frac{D\rho_G^*}{Dt^*} + \rho_G^* \left(\frac{\partial w_G^*}{\partial r^*} + \frac{w_G^*}{r^*} \right) = 0 \tag{A.7}$$

Bilan de quantité de mouvement :

$$\gamma Ma^2 \rho_G^* \frac{Dw_G^*}{Dt^*} = -\frac{\partial p_G^*}{\partial r^*} + \frac{4}{3} \gamma \frac{Ma^2}{Re_G^2} \left[\left(\frac{\partial^2 w_G^*}{\partial r^{*2}} + \frac{2}{r^*} \frac{\partial w_G^*}{\partial r^*} - \frac{2 w_G^{*2}}{r^{*2}} \right) \theta_G^* + \left(\frac{\partial w_G^*}{\partial r^*} + \frac{w_G^*}{r^*} \right) \frac{\partial \theta_G^*}{\partial r^*} \right] \quad (A.8)$$

Bilan d’enthalpie :

$$\rho_G^* \frac{D\theta_G^*}{Dt^*} = \frac{Pe_G^{-1}}{r^{*2}} \frac{\partial}{\partial r^*} \left(r^{*2} \theta_G^* \frac{\partial w_G^*}{\partial r^*} \right) + \left(\frac{\gamma - 1}{\gamma} \right) \frac{Dp_G^*}{Dt^*} + \frac{4}{3} (\gamma - 1) \frac{Ma^2}{Re_G} \left(\frac{\partial w_G^*}{\partial r^*} + \frac{w_G^*}{r^*} \right)^2 \theta_G^* \quad (A.9)$$

Loi d’état :

$$p_G^* = \mathcal{R} \rho_G^* \theta_G^* \quad (A.10)$$

Dans ces équations $\frac{D}{Dt^*}$ représente la dérivée particulaire. Les nombres adimensionnels qui apparaissent dans ces équations sont le coefficient de Laplace $\gamma = \frac{cp}{cv} \Big|_G$, le nombre de Mach $Ma = \frac{\dot{R}_1}{\sqrt{\gamma R \theta_1}}$, le nombre de Reynolds $Re_G = \dot{R}_1 R_1 \frac{\rho_1}{\mu_1}$ et le nombre de Péclet $Pe_G = Re_G Pr_G$ où Pr_G est le nombre de Prandtl.

Dans de nombreuses études analogues à la nôtre, il se trouve que :

$$Ma^2 \ll 1 \quad (A.11)$$

$$Ma^2 \ll Re_G \quad (A.12)$$

Si bien que le système d’équations qui résulte s’écrit, en omettant le symbole * par souci de simplicité :

$$\frac{1}{\rho_G} \frac{D\rho_G}{Dt} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 w_G) = 0 \quad (A.13)$$

$$\rho_G \frac{D\theta_G}{Dt} = \frac{Pe_G^{-1}}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \theta_G \frac{\partial \theta_G}{\partial r} \right) + \left(\frac{\gamma - 1}{\gamma} \right) \frac{Dp_G}{Dt} \quad (A.14)$$

$$p_G = \mathcal{R} \rho_G \theta_G \quad (A.15)$$

Le bilan de quantité de mouvement se réduit à :

$$\frac{\partial p_G}{\partial r} = 0 \quad (A.16)$$

et permet d’affirmer que p_g est uniforme dans la bulle. Les conditions aux limites qui ne comportent pas de nombres adimensionnels restent formellement les mêmes. La condition interfaciale de quantité de mouvement fait exception avec le terme de tension superficielle et avec les termes de viscosité ; ces termes seront négligés comme dans le modèle classique (cf. section 4.5.2) et il résulte une simple égalité des pressions gaz liquide à l’interface :

$$(p_G - p_L)_{r=R(t)} = 0 \quad (A.17)$$

Les conditions initiales s’écrivent :

$$\begin{aligned} R(0) &= 1 \\ w_G(r, 0) &= r \\ p_G(0) &= 1 \\ \theta_G(0) &= 1 \end{aligned} \quad (A.18)$$

Les équations A.13, A.14, A.15 et A.16 ont été établies avec l’objectif de montrer l’influence centrale du nombre de Péclet Pe_g qui est en fait le rapport du temps de transfert thermique convectif sur le temps de transfert par conduction thermique. Les modèles simplifiés que constituent le modèle isentropique et le modèle isotherme résultent en fait de valeurs limites qu’adoptent Pe_g , soit $Pe_g \gg 1$, soit $Pe_g \ll 1$ respectivement, sans que les utilisateurs de ces modèles ne le précisent systématiquement. Ces liens vont être ici rappelés.

Remarquons tout d’abord que les choix d’échelles de vitesse et de rayon adoptés plus haut correspondent aux phases initiales d’expansion et finale de rétraction. Il est facile de constater que ces choix correspondent à des nombres de Reynolds Re_G élevés et donc également des nombres de Péclet $Pe_G = Pr_G Re_G$ élevés étant donné que Pr_G est d’ordre 1 pour la plupart des gaz. Lorsque la bulle atteint son rayon maximal la vitesse se réduit jusqu’à s’annuler et d’autres échelles auraient dû alors être adoptées pour cette phase.

Dans l’étude du cas $Pe_G \ll 1$ qui va être d’abord considéré, on admettra que les échelles adoptées, que nous ne précisons pas, sont pertinentes ; le but de notre démarche dans cette section étant, rappelons-le, de pointer la complexité du comportement de la bulle sans toutefois s’engager dans une résolution concrète.

Le bilan d’enthalpie A.14 peut se réécrire avec la loi d’état A.15 :

$$\frac{1}{\theta_G} \frac{D\theta_G}{Dt} = \frac{Pe_G^{-1}}{p_G r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \theta_g \frac{\partial \theta_g}{\partial r} \right) + \left(\frac{\gamma - 1}{\gamma} \right) \frac{1}{p_G} \frac{Dp_G}{Dt} \quad (A.19)$$

Considérons le passage à la limite $Pe_G \rightarrow 0$. A l’ordre 0 il vient :

$$\frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \theta_{G0} \frac{\partial \theta_{G0}}{\partial r} \right) = 0 \quad (A.20)$$

et à cet ordre il est clair, compte tenu des conditions aux limites au centre de la bulle A.5 et à sa surface A.18, que la température est uniforme et constante :

$$\theta_{G0} = \theta_L \quad (A.21)$$

La loi d’état permet de montrer que la masse volumique est simplement uniforme :

$$\rho_{G0}(t) = \frac{p_{G0}(t)}{\mathcal{R}\theta_{G0}} \quad (A.22)$$

Après introduction de l’équation précédente dans le bilan de masse A.13, on obtient :

$$\frac{\partial}{\partial r} (r^2 w_{G0}) = - \frac{D(\ln \rho_{G0})}{Dt} r^2 \quad (A.23)$$

Cette équation peut s’intégrer en r en remarquant que $\frac{D(\ln\rho_{G0})}{Dt}$ ne dépend que de t et en utilisant les conditions A.5 au centre de la bulle, il vient :

$$w_{G0} = -\frac{1}{3} \frac{D(\ln\rho_{G0})}{Dt} r \quad (\text{A.24})$$

La condition A.18 à l’interface permet d’écrire :

$$\dot{R}_0 = -\frac{1}{3} \frac{D(\ln\rho_{G0})}{Dt} R_0 \quad (\text{A.25})$$

Cette équation entraîne deux conséquences. Le profil de vitesse s’écrit :

$$w_{G0}(r, t) = \frac{\dot{R}_0(t)}{R_0(t)} r \quad (\text{A.26})$$

et l’intégration en t de l’équation A.25 donne, après la transformation :

$$\frac{D(\ln\rho_{G0})}{Dt} = \frac{D}{Dt} \ln \left(\frac{\dot{R}_0(t)}{R_0(t)} \right)^3 \quad (\text{A.27})$$

l’équation suivante :

$$\frac{4}{3} \pi R_0^3 \rho_{G0} = m \quad (\text{A.28})$$

où la constante m est en fait la masse de la bulle. Il en résulte, $V_0(t) = \frac{4}{3} \pi R_0^3$ étant le volume de la bulle. En utilisant la loi d’état A.23 :

$$p_{G0}(t) V_0(t) = m \mathcal{R} \theta_{G0} = \text{constante} \quad (\text{A.29})$$

Cette dernière équation traduit le comportement isotherme de la bulle correspondant, comme signalé plus haut, à la phase d’atteinte du rayon maximal.

Considérons maintenant le passage à la limite opposée $Pe_G \rightarrow 0$. A l’ordre 0 du bilan d’énergie, il vient :

$$\frac{1}{\theta_G} \frac{D\theta_g}{Dt} = \left(\frac{\gamma - 1}{\gamma} \right) \frac{1}{p_G} \frac{Dp_g}{Dt} \quad (\text{A.30})$$

soit :

$$\frac{D}{Dt} \ln(\theta_{G0}) = \left(\frac{\gamma - 1}{\gamma} \right) \frac{D}{Dt} \ln(p_{G0}) \quad (\text{A.31})$$

La température est donc uniforme mais variable dans le temps :

$$\theta_{G0}(t) = F p_{G0}^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} \quad (\text{A.32})$$

La loi d’état demeure inchangée à l’ordre 0 :

$$\theta_{G0}(t) = \frac{p_{G0}(t)}{\mathcal{R} \rho_{G0}(t)} \quad (\text{A.33})$$

Si on élimine $\theta_{G0}(t)$ entre les équations A.32 et A.33, il vient :

$$p_{G0}(t) = (FR)^\gamma \rho_{G0}^\gamma(t) \tag{A.34}$$

ou encore, en utilisant A.25 qui ne dépend pas de l’approximation considérée :

$$p_{G0}(t)V_0^\gamma(t) = (mFR)^\gamma = \text{constante} \tag{A.35}$$

Cette équation correspond à l’approximation isentropique. Un point important doit être noté. La température A.32 est conditionnée dans la majeure de la bulle par le travail d’expansion et d’effondrement. Elle ne peut donc se raccorder à la température du liquide à la surface de la bulle ; ce raccord ne peut se réaliser que par conduction dans une couche limite thermique, ce qui suppose pour la décrire d’y changer l’échelle de longueur qui n’est plus R_1 mais $\frac{R_1}{\sqrt{Pe_G}}$.

Cette couche limite qui existe pour $Pe_G \gg 1$, même en admettant des changements de phase, ou en admettant que la température du liquide évolue, permet de confiner les phénomènes thermiques qui se trouvent découplés des phénomènes dynamiques. Les phénomènes thermiques peuvent de ce fait être ignorés si on se limite à décrire le mouvement de la bulle. Cela explique le succès de l’hypothèse isentropique. On cherche même à étendre cette dernière en utilisant l’hypothèse polytropique formellement analogue, via l’introduction d’une constante ajustable à la place du coefficient γ . Il reste que les phénomènes physiques à décrire en général de la combinaison entre travail d’expansion et d’effondrement et échange de chaleur par conduction ; en toute rigueur ils nécessitent d’utiliser toutes les équations de champ introduites plus haut entre les deux cas limites « commodes » sur le plan de la modélisation à savoir $Pe_G \ll 1$ et $Pe_G \gg 1$. Ces différents cas sont représentés au cours de l’évolution de la bulle sur la figure suivante.

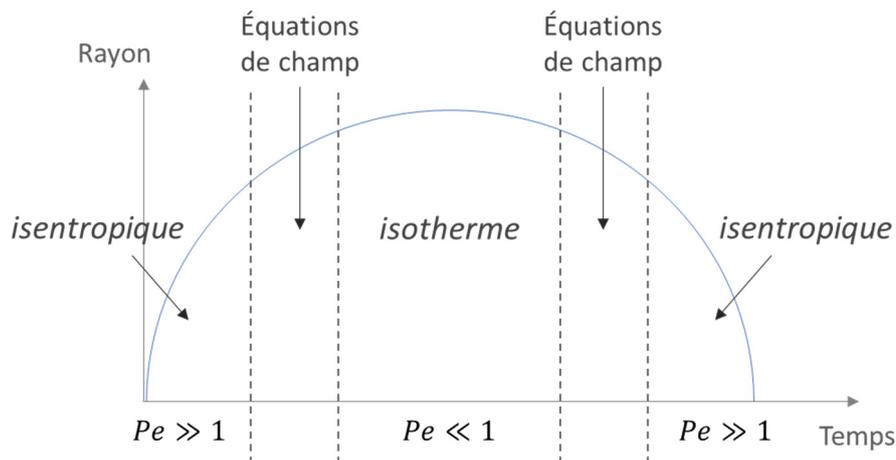


Figure 37 : Représentation des éventuelles approximations les plus proches de la réalité lors de l’évolution du rayon de la bulle.

Chapitre 3

Inventaire des mécanismes potentiels à l'origine de la lyse

Le chapitre précédent ayant permis de cerner les conditions de l'étude menée dans cette thèse, il apparaît désormais nécessaire de détailler de manière exhaustive les différents phénomènes engendrés par la décharge haute tension dans l'eau pouvant conduire à la lyse de microorganismes.

Le présent chapitre débute ainsi par un bilan énergétique complet permettant d'identifier les voies d'utilisation de l'énergie électrique injectée au niveau des électrodes. Chacune de ces voies est brièvement étudiée dans les paragraphes suivants afin d'estimer leur impact potentiel respectif sur la lyse.

1. Bilan des différents postes de dépense de l’énergie du générateur électrique

Comme nous l’avons vu dans le chapitre précédent, l’énergie stockée dans le condensateur au terme de sa charge, $W_{accumulée} = \frac{1}{2}CU^2$ vaut 2,25 J. L’énergie électrique déposée entre les électrodes au cours de l’impulsion peut être facilement calculée par l’intégrale $W_{cuve} = \int U(t)I(t)dt$ en prenant pour bornes le début et la fin de l’impulsion. D’après nos mesures, cette intégrale vaut environ 0,3 J. Une part non négligeable de l’énergie, environ 85 %, est donc dépensée dans le circuit électrique du générateur, principalement dans la résistance de protection. Observons qu’une optimisation du circuit électrique sera indispensable pour poursuivre le développement ultérieur de ce système de lyse dans le cadre d’une bioproduction dans lequel le coût énergétique est un paramètre important.

Par la suite, nous avons tenté d’établir une liste exhaustive des différents postes de dépense de l’énergie électrique déposée dans le liquide au niveau des électrodes pendant l’impulsion haute tension. Cette liste est présentée dans le schéma ci-dessous.

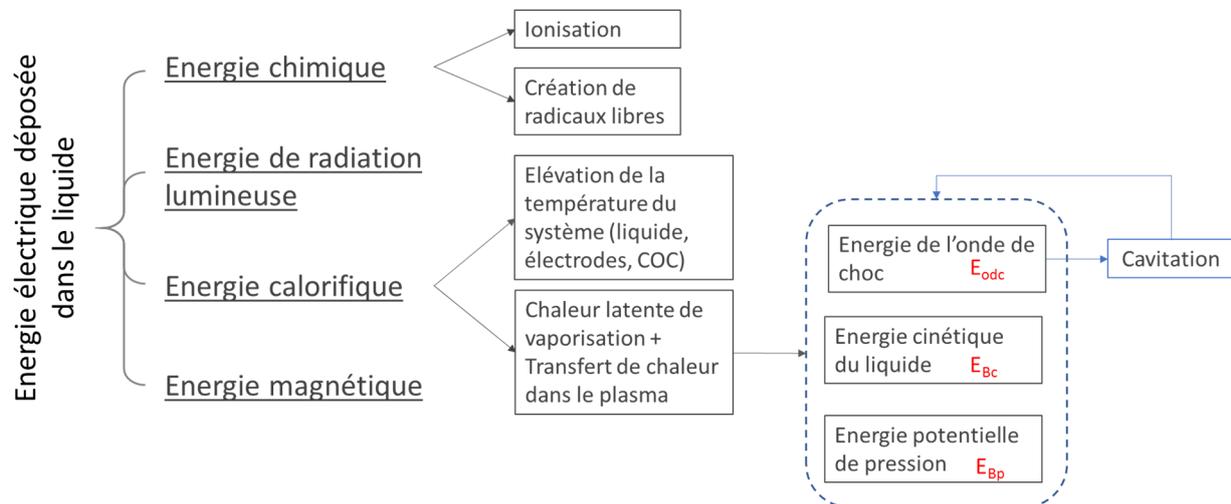


Figure 38 : Bilan des différents postes de dépense d’énergie dans le liquide à partir des travaux de thèse de Broyer (1995) et Wilhelm (1973).

L’énergie électrique apportée au liquide par le biais des électrodes est convertie en 4 formes principales d’énergie : chimique, radiative, calorifique et magnétique. Les bilans chiffrés que l’on peut trouver dans la littérature ne s’accordent pas sur la même répartition énergétique. Néanmoins, les différents auteurs considèrent généralement que la transformation en énergie calorifique est prépondérante, les autres transformations pouvant être négligées.

Dans la suite de ce chapitre nous tâcherons d’isoler à partir de ce bilan d’énergie différents acteurs potentiels de la lyse de microorganismes. Ces acteurs seront ensuite testés sur des microalgues puis des bactéries dans les chapitres suivants.

2. Champ électrique

Lorsqu'un champ électrique est appliqué dans le volume de liquide diélectrique contenant des microorganismes, la différence de potentiel créée au niveau des membranes cellulaires peut causer leur rupture. Cette technique de lyse est appelée « électroporation » (cf. chapitre 1). Dans ce paragraphe, le champ électrique engendré avant le claquage diélectrique est étudié.

2.1. Simulation du champ électrique produit

Le champ électrique produit lors de l'impulsion haute tension est simulé dans la cuve en U afin d'établir une cartographie de l'intensité du champ électrique. La simulation est effectuée en tenant compte des paramètres du générateur (tension, temps de montée en tension) avec de l'eau de conductivité standard dans cette étude (50mS/m). Le champ électrique a été modélisé dans un plan contenant les électrodes de décharge et perpendiculaire à la surface libre de la cuve. La cartographie présentée en Figure 39 donne une estimation du champ électrique (affiché en échelle logarithmique) généré 2 μ s après le déclenchement de l'impulsion haute tension.

Il est à noter qu'en pratique, à cette échelle de temps, il y a aussi apparition des streamers qui « consomment » une partie de l'énergie électrique disponible et modifient la répartition du champ. En réalité le champ électrique dans la cuve a donc une intensité plus faible que celle présentée ici.

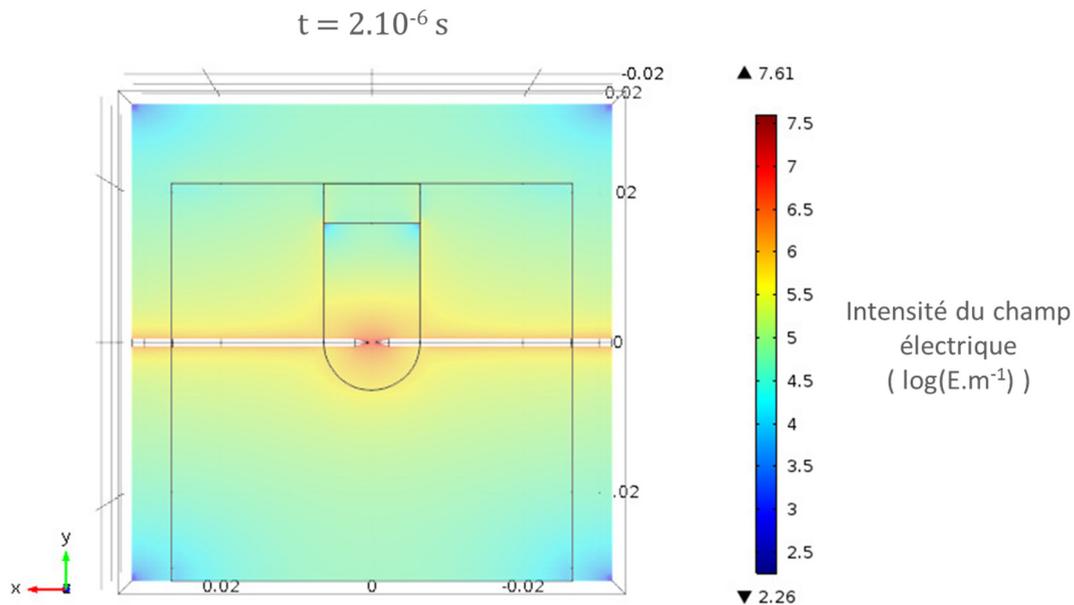


Figure 39 : Cartographie du champ électrique produit avant le claquage diélectrique dans la cuve en U (simulation effectuée à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics 5.2).

2.2. Analyse de la cartographie

Comme nous pouvons le prévoir, le champ est maximal entre les pointes des électrodes et prend pour valeur 10^7 V.m^{-1} .

Afin de faciliter l'analyse de la cartographie précédemment présentée, l'image a été convertie en niveaux de gris et son histogramme a été étudié. A partir de celui-là il est possible de calculer que dans le liquide contenu dans la cuve :

- La valeur moyenne du champ électrique est de $2,5 \cdot 10^6 \text{ V.m}^{-1}$
- Le champ électrique est inférieur à 10^6 V.m^{-1} dans 50% du volume.

2.3. Conclusion

Pour rappel du chapitre 1, un potentiel transmembranaire d'environ 0,2 à 1 V est nécessaire pour former des pores à travers la membrane. Pour des cellules dont les membranes ont une épaisseur de l'ordre de la dizaine de nanomètres, cela correspond à un champ électrique de l'ordre de 10^8 V.m^{-1} pour des impulsions d'une largeur de quelques microsecondes à quelques millisecondes.

Certains auteurs rapportent des phénomènes d'électroporation à des potentiels plus faibles de l'ordre de 10^6 V.m^{-1} avec cependant des temps d'exposition plus longs que ceux employés dans nos travaux (Ho & Mittal, 1996), ou même l'utilisation d'un champ continu plutôt qu'un champ pulsé (Brown & Audet, 2008).

En conclusion, compte tenu de la relativement faible valeur du champ électrique dans une portion importante du liquide contenu dans la cuve, mais surtout de la très faible durée d'exposition, l'arc électrique apparaissant autour de 10 μs après le début de l'impulsion, nous considérerons que le phénomène d'électroporation est très limité voire inexistant sur les microorganismes en solution lors des expériences menées dans notre étude.

3. Rayonnement et production de radicaux libres et d'espèces oxydantes

3.1. Etude du rayonnement lumineux

3.1.1. Intérêt de la mesure

La plupart des bilans énergétiques dans la littérature montrent que l'énergie radiative libérée lors d'un claquage diélectrique suite à une impulsion de tension de quelques microsecondes est négligeable (Aitken, McCluskey, & Denat, 1996). L'intensité du rayonnement n'est donc pas estimée de manière quantitative dans nos travaux. En revanche, l'analyse qualitative du spectre lumineux émis donne des informations concernant la composition chimique du plasma formé lors de la décharge.

3.1.2. Matériels et méthodes

L'acquisition du spectre d'émission est effectuée à l'aide d'un spectroscope (Ocean Optics, USB2000+) capable d'enregistrer des longueurs d'ondes du proche ultra-violet au proche infrarouge. La mesure est effectuée à l'aide d'une fibre optique placée derrière la cuve en U. Il est à noter que la lumière analysée traverse donc la paroi en COC.

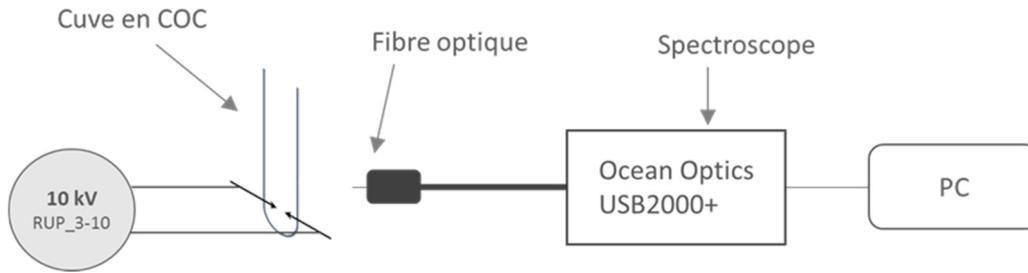


Figure 40 : Schéma du montage permettant la mesure du spectre lumineux.

Le spectre présenté est une moyenne effectuée sur trois acquisitions successives dont un bruit moyen a été soustrait.

3.1.3. Résultats

Le spectre d’émission obtenu lors d’une décharge de 30 μ s est présenté en Figure 41. Certains pics caractéristiques sont repérés et identifiés.

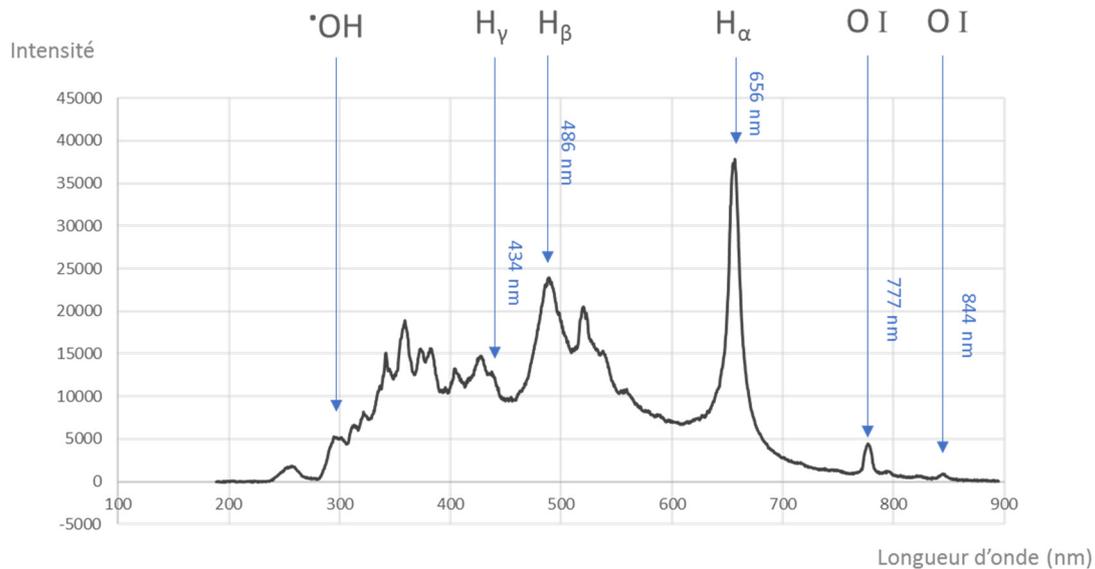
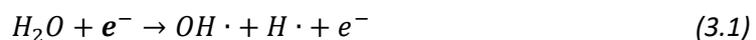


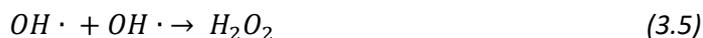
Figure 41 : Spectre d’émission d’une décharge de 30 μ s dans l’eau courante.

Les pics notés H α , H β , H γ correspondent aux trois premières raies de la série de Balmer. Certaines raies caractéristiques de l’atome d’oxygène sont également présentes dans le proche infrarouge (identifiées à partir des données disponibles sur le site internet du « National Institute of Standards and Technology »). D’après Sato et col. (1996), la bande observable sur le spectre autour de 300 nm correspond à l’émission de \cdot OH. Cette analyse succincte du spectre d’émission du plasma formé lors de la décharge haute tension permet toutefois de conclure que celui-là contient plusieurs espèces radicalaires provenant de la décomposition de molécules d’eau.

Ces équations de décomposition de l’eau sont données ci-dessous d’après le mécanisme proposé par Joshi et col. (1995). L’électron noté en gras est un électron de haute énergie provenant de la décharge haute tension.



Les espèces radicales formées peuvent réagir entre elles pour former des molécules de peroxyde d'hydrogène et de dihydrogène selon les équations suivantes :



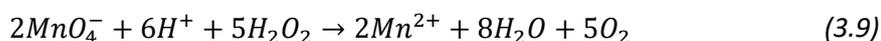
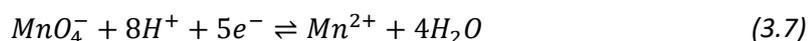
3.2. Analyse chimique

Sato et col. (1996) concluent que la seule espèce oxydante persistante et produite dans des quantités significatives est le peroxyde d'hydrogène. Dans la suite de ce paragraphe, cet oxydant est dosé par colorimétrie à l'aide du permanganate de potassium. Des échantillons d'eau sont traités par un nombre variable de décharges haute tension et leurs teneurs en peroxyde d'hydrogène dosées.

3.2.1. Matériels et méthodes

3.2.1.1. Équation de titrage

Le titrage du peroxyde d'hydrogène s'effectue en solution légèrement acidifiée selon la réaction décrite par l'équation de bilan 3.9, mettant en jeu les couples oxydo-réducteurs décrits dans les équations 3.7 et 3.8.



Cette réaction étant totale, les coefficients stœchiométriques de son équation de bilan permettent d'écrire qu'à tout moment :

$$n_{H_2O_2 \text{ initial}} = \frac{5}{2} n_{MnO_4^- \text{ consommé}} \quad (3.10)$$

3.2.1.2. Gamme d'absorption du permanganate dans l'eau

Afin de pouvoir utiliser la relation 3.10 pour estimer la quantité initiale de peroxyde d'hydrogène, la concentration en permanganate est suivie par mesure de l'absorbance de l'échantillon. Les spectres d'absorbance sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan M1000. Cet appareil utilise des plaques de micro-puits à fond transparent, remplis de 300 µL de solution à analyser.

Le spectre d'absorbance obtenu est marqué par deux pics caractéristiques de la présence de permanganate en solution aqueuse : un pic à la longueur d'onde de 524 nm et un pic à 544 nm. Des gammes de concentrations (cf. Figure 42) ont été réalisées en utilisant ces deux pics ; elles sont présentées en Figure 43.

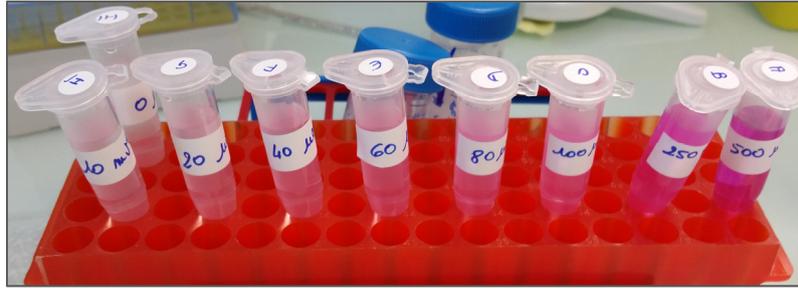


Figure 42 : Gamme de concentrations du permanganate dans l'eau.

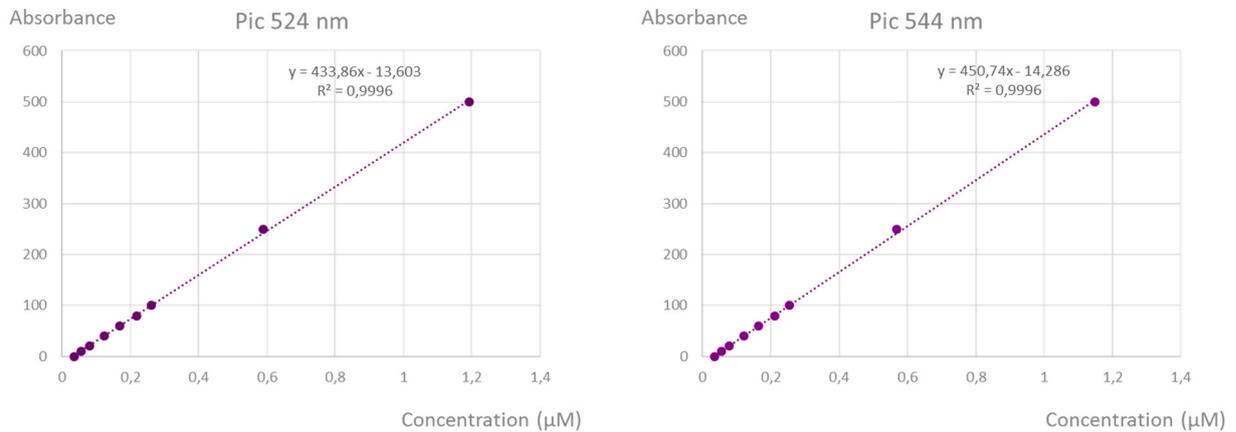


Figure 43 : Gammes de concentrations obtenues à partir de l'absorption des pics à 524 nm et 544 nm du permanganate dans l'eau.

Les relations suivantes sont donc retenues pour relier l'absorbance A de la solution à sa concentration C en peroxyde d'hydrogène :

A partir du pic à 524 nm : $C = 434 \times A - 14$ avec C en μM (10^{-6} mol.L),

A partir du pic à 544 nm : $C = 451 \times A - 14$ avec C en μM (10^{-6} mol.L).

3.2.1.3. Titrage du peroxyde d'hydrogène

Le mélange de titrage est une solution aqueuse légèrement acidifiée de permanganate de potassium à $97 \mu\text{M}$. Le titrage est effectué en mélangeant $150 \mu\text{L}$ d'eau à 50 mS/m traitée par les décharges électriques avec $1350 \mu\text{L}$ de cette solution mère.

La concentration en permanganate dans l'échantillon est ensuite mesurée par absorbance en relevant l'amplitude des pics à 524 nm et 544 nm. Une moyenne sur deux puits est retenue pour chaque échantillon. Une fois la concentration en permanganate dans le puits de spectrophotomètre connue, il est possible de remonter à la quantité de peroxyde d'hydrogène contenu dans l'échantillon traité par les décharges haute tension. Notons $[\text{MnO}_4^-]_{\text{mesuré}}$ la concentration en permanganate mesurée dans le puits. Il est alors possible de calculer la quantité de permanganate ayant réagi lors du mélange des $1350 \mu\text{L}$ de solution mère avec les $150 \mu\text{L}$ d'eau traitée par les décharges haute tension :

$$n_{\text{MnO}_4^- \text{ consommé}} = 97 \mu\text{M} \times 1350 \mu\text{L} - [\text{MnO}_4^-]_{\text{mesuré}} \times 1500 \mu\text{L} \quad (3.11)$$

En supposant que tout le peroxyde d'hydrogène présent initialement dans l'échantillon de 1500 μL a réagi avec le permanganate et que la seule réaction consommant le permanganate est la réaction de titrage (cf. équation 3.9) il est possible d'écrire à partir de l'équation 3.10 :

$$n_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ initial}} = \frac{5}{2} (1,31 \cdot 10^{-7} \text{ mol} - [\text{MnO}_4^-]_{\text{mesuré}} \times 1500 \mu\text{L}) \quad (3.12)$$

Comme on considère que H_2O_2 provient des 150 μL d'échantillon traité par les impulsions haute tension, on peut en déduire :

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{échantillon}} = \frac{n_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ initial}}}{150 \mu\text{L}} \quad (3.13)$$

C'est-à-dire :

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{échantillon}} = \frac{\frac{5}{2} (1,31 \times 10^{-7} \text{ mol} - [\text{MnO}_4^-]_{\text{mesuré}} \times 1500 \mu\text{L})}{150 \mu\text{L}} \quad (3.14)$$

3.2.2. Mesure des concentrations en peroxyde d'hydrogène dans les échantillons traités

A partir de la relation 3.14 établie dans le paragraphe précédent, le graphique présenté en Figure 44 est obtenu. Il met en évidence, dans la gamme étudiée, une relation linéaire entre la concentration en peroxyde d'hydrogène de la solution traitée et le nombre de décharges haute tension subies par l'échantillon d'eau.

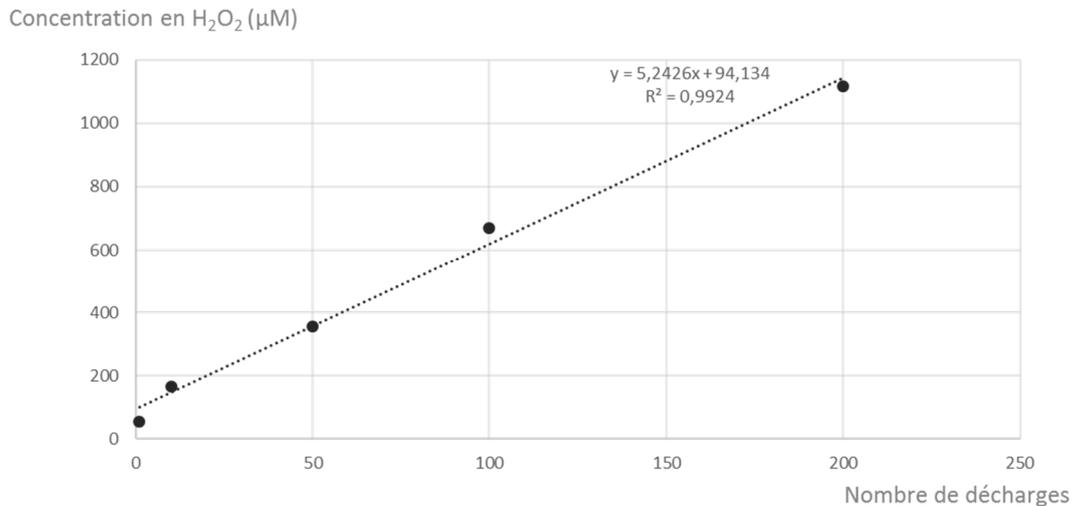


Figure 44 : Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans la solution traitée en fonction du nombre de décharges.

Lors d'un traitement par 200 décharges haute tension, la concentration en peroxyde d'hydrogène dans l'échantillon est donc d'environ 1,1 mM. Cette valeur sera retenue comme étant la concentration maximale en peroxyde d'hydrogène atteignable dans nos expériences.

4. Effets mécaniques

L'apparition brutale d'une bulle de vapeur dans l'espace inter-électrode engendre différents phénomènes mécaniques présentés succinctement dans ce paragraphe. Il est important dans notre étude d'évaluer l'incidence de ces phénomènes sur la destruction des microorganismes. Ces phénomènes sont fortement influencés par le confinement imposé par les parois de la cuve en U utilisée (cf. chapitre 2, paragraphe 5).

4.1. Effet du confinement sur le collapse

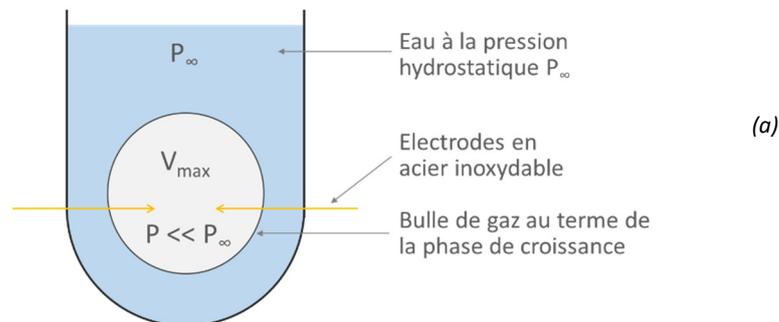
Lors de l'effondrement, la pression intérieure à la bulle de gaz est très inférieure à la pression hydrostatique. La bulle agit alors comme une pompe aspirant le liquide autour d'elle. Cependant, la présence de parois à proximité de la bulle limite, voire empêche, l'arrivée d'eau. Dans notre géométrie, l'aspiration d'eau dans la bulle s'effectuera dans la direction la plus favorable, c'est-à-dire par le haut. Cette arrivée d'eau forme un « étranglement » au sein de la bulle (cf. schéma (b) en Figure 45), entraînant la formation d'un jet dirigé vers le fond de la cuve.

La position des parois plus ou moins proches de l'espace inter-électrodes, ainsi que la présence d'une surface libre, entraîne une dissymétrie lors de la phase de collapse de la bulle ; on parle alors d'un collapse anisotrope. Cette propriété est expliquée à l'aide de la Figure 45. Les schémas présentés sont mis en parallèle avec des images obtenues expérimentalement dans la cuve en U suite à une décharge haute tension de 30 μ s dans l'eau (cf. paragraphe 2 du chapitre 2).

Volume maximal de la bulle de gaz



$t = 370 \mu s$



Collapse anisotrope de la bulle de gaz



$t = 770 \mu s$

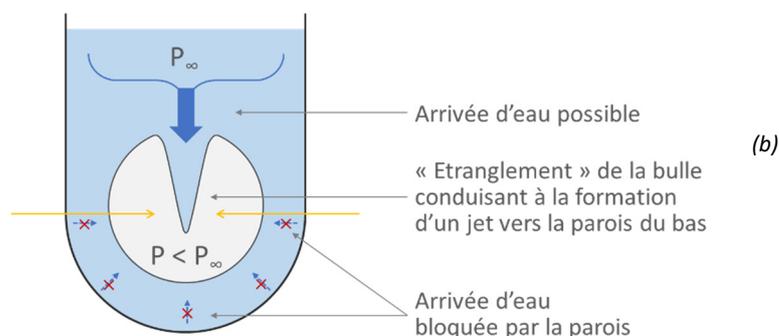


Figure 45 : Formation d'un jet lors du collapse anisotrope de la bulle dans la cuve en U : (a) Situation à la fin de la phase de croissance de la bulle, (b) Collapse conduisant à la formation d'un jet.

Si le jet de cavitation formé est à l'origine du phénomène appelé « érosion de cavitation » connu car il est notamment responsable de la destruction des hélices de navires, son effet sur la destruction des microorganismes dans notre étude est relativement limité pour deux raisons :

- Lors d'une séquence de traitement de 200 décharges (séquence la plus longue utilisée dans nos expériences), le nombre de jets produits est limité,
- L'effet du jet est très localisé ; seuls quelques microorganismes peuvent être touchés par ce jet, la très grande majorité des microorganismes étant situés à distance du lieu d'impact.

4.2. Cisaillement

En considérant le mouvement de croissance et collapse d'une bulle quasi-sphérique formée au niveau du foyer des électrodes de décharge, des zones de cisaillement à proximité des parois rapprochées de la cuve peuvent apparaître. Une étude à l'aide de paramètres adimensionnels va permettre d'évaluer l'importance de ce phénomène par rapport aux autres effets mécaniques aux échelles considérées. La cuve est représentée en coordonnées cartésiennes selon le schéma en Figure 46.

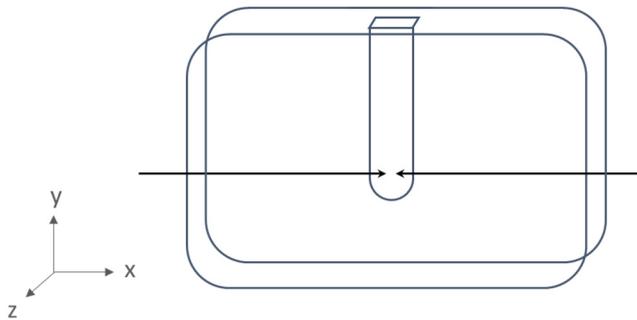


Figure 46 : Cuve en U dans un repère cartésien.

Rappelons la formulation vectorielle de l'équation bilan de la quantité de mouvement permettant de décrire le mouvement du fluide dans la cuve :

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{\nabla}(\vec{v} \otimes \vec{v}) = -\frac{1}{\rho} \vec{\nabla} p + \nu \vec{\nabla}^2 \vec{v} + \vec{g} \quad 3.15$$

Avec $\nu = \frac{\mu}{\rho}$ la viscosité cinématique.

Les ordres de grandeurs de chacune des variables utilisées dans cette équation sont déterminés en mettant la variable sous forme adimensionnelle :

- Pression :

$$P^* = \frac{P}{P_{max}} \quad P_{max} \text{ la pression maximum atteinte au sein de la bulle de vapeur.}$$

- Longueur :

$$l^* = \frac{l}{l_0} \quad l_0 \text{ la hauteur maximale d'eau au-dessus des électrodes, soit } l_0 = 40 \text{ mm.}$$

- Vitesse :

$$v^* = \frac{v}{v_{g/l}} \quad v_{g/l} \text{ la vitesse de l'interface gaz-liquide au niveau de la bulle formée. D'après les mesures effectuées dans le chapitre 2, } v_{g/l} = 10 \text{ m. s}^{-1}$$

Chapitre 3 – Inventaire des mécanismes potentiels à l'origine de la lyse

- Masse volumique :

$$\rho^* = \frac{\rho}{\rho_{0eau}} \quad \rho_{0eau} \text{ la masse volumique de l'eau. En considérant un milieu incompressible, celle-ci n'évolue pas.}$$

- Temps :

$$t^* = \frac{t}{t_{g/c}} \quad t_{g/c} \text{ le temps total de croissance et décroissance de la bulle.}$$

Le bilan de la quantité de mouvement dans le fluide (cf. équation 3.15) est adimensionnalisé en utilisant les échelles introduites dans les variables précédentes. On se restreindra à écrire ce bilan sous forme projetée (ici selon l'axe y par exemple, mais le raisonnement aurait été le même en projetant selon les autres directions). Considérons donc l'équation projetée selon la verticale y :

$$\begin{aligned} \frac{v_{g/l}}{t_{g/c}} \frac{\partial v_y^*}{\partial t^*} + \frac{v_{g/l}^2}{l_0} \left(v_y^* \frac{\partial v_y^*}{\partial x} + v_y^* \frac{\partial v_y^*}{\partial y} + v_z^* \frac{\partial v_y^*}{\partial z} \right) \\ = -\frac{1}{\rho} \frac{p_{max}}{l_0} \frac{\partial p^*}{\partial y} + v \frac{v_g}{l_0^2} \left(\frac{\partial^2 v_y^*}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y^*}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_y^*}{\partial z^2} \right) - g \end{aligned} \quad (3.16)$$

Les groupements adimensionnels peuvent alors être comparés entre eux. Le terme de viscosité est comparé avec le terme inertiel permanent et le terme inertiel transitoire :

$$\frac{v \frac{v_{g/l}}{l_0^2}}{\frac{v_{g/l}^2}{l_0}} = \frac{v}{l_0 v_{g/l}} = \frac{10^{-6}}{4 \cdot 10^{-2} \times 10} = 2,5 \cdot 10^{-4} \quad (3.17)$$

$$\frac{v \frac{v_{g/l}}{l_0^2}}{\frac{v_{g/l}}{t_{g/c}}} = \frac{v \cdot t_{g/c}}{l_0^2} = \frac{10^{-6} \times 10^{-3}}{(4 \cdot 10^{-2})^2} = 6 \cdot 10^{-7} \quad (3.18)$$

On en déduit que le terme de viscosité est ici négligeable devant les termes inertiels. A l'échelle de temps considérée, les phénomènes de viscosité sont donc confinés dans de fines couches limites près des parois et peuvent donc ne pas être pris en compte dans un premier temps. Les forces de cisaillement ne sont donc pas retenues comme responsables de la lyse.

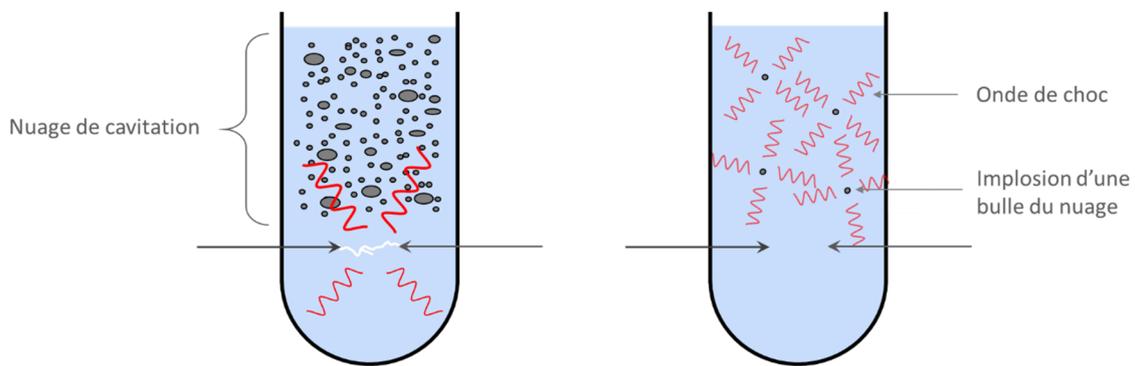
4.3. Ondes de pression

4.3.1. Produites dans l'espace inter-électrodes

Dans le chapitre 2, la production d'ondes de choc autour du foyer des électrodes a été mise en évidence. Ces ondes de choc sont produites soit lors de l'apparition de l'arc électrique, soit lors des collapsés de la bulle de vapeur et ses différents rebonds. En considérant une atténuation de l'énergie en $\frac{1}{r^2}$, les ondes de choc issues de l'apparition de l'arc électrique et du collapse de la première bulle de vapeur ont une amplitude du même ordre de grandeur : 35 MPa autour du point source dans la cuve infinie (cf. section 2.4.4 du chapitre 2). Un effet de ces ondes de pression est attendu sur les microorganismes présents dans la cuve.

4.3.2. Produits par le collapse des bulles du nuage de cavitation

L'onde de choc qui naît dans l'espace inter-électrodes peut engendrer en milieu confiné un nuage de cavitation. Ce dernier, composé de nombreuses bulles de cavitation, résulte du passage d'une dépression sur des sites de nucléation, tels que les microorganismes ou des impuretés en suspension dans le liquide. La dépression évoquée est associée à l'onde de choc formée lors du claquage diélectrique (Broyer, 1995 ; Van der Worp et col., 2013). L'évolution de ces bulles de vapeur est à l'origine de phénomènes sensiblement identiques à ceux décrits dans le chapitre 2 suite à la vaporisation du liquide lors de la formation de l'arc électrique, en particulier la production d'ondes de choc lors du collapse de la bulle et de ses éventuels rebonds. On peut s'attendre à ce que ces brusques variations de pression jouent un rôle dans la lyse des microorganismes (cf. Figure 47).



- ① Formation d'un nuage de cavitation suite au passage de l'onde de choc sur des sites de nucléation
- ② Effondrement du nuage de cavitation et production d'ondes de choc

Figure 47 : Schéma de synthèse de la formation et de l'effondrement du nuage de cavitation dans la cuve en U.

Le nuage de cavitation a pu être observé dans la cuve en U (cf. Figure 48). Les enregistrements présentés ont été obtenus pour différents niveaux de remplissage de la cuve. Sur les photos, l'apparition d'une « zone interdite » à proximité du foyer des électrodes, dans laquelle le nuage de cavitation ne se développe pas, peut être remarquée.

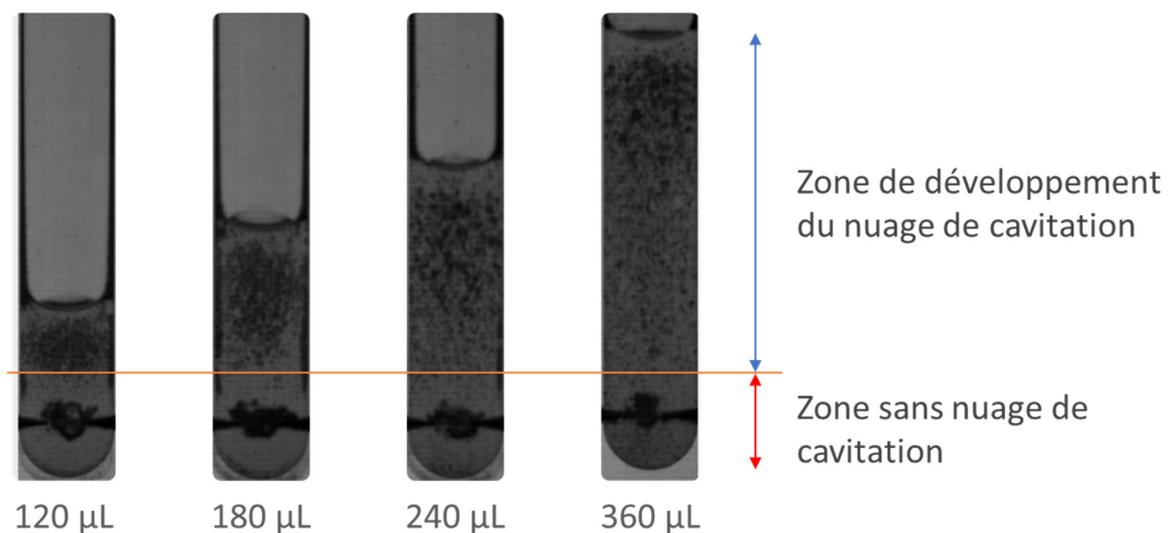


Figure 48 : Déploiement du nuage de cavitation pour différents niveaux de remplissage de la cuve en U.

L'existence d'une « zone interdite » empêche d'établir une relation linéaire entre la hauteur d'eau et le nombre de sites de cavitation. La présence de cette zone est cohérente avec certains travaux sur les explosions dans lesquels on remarque que la dépression associée à l'onde de choc est observable à partir d'une certaine distance du point source (Ling et col., 2009).

En outre, le nombre de sites de nucléation est manifestement lié à la hauteur d'eau dans la cuve ; de même nous nous attendons à ce qu'il dépende également de la concentration en particules en suspension (en particulier lors de la présence de microorganismes). Ces remarques nous intéresseront plus particulièrement lorsque nous chercherons à expliquer les résultats obtenus suite à l'étude paramétrique menée dans le chapitre suivant.

5. Echauffement

5.1. Mesures

Afin d'illustrer l'évolution de la température dans la cuve en U remplie d'eau courante, les résultats suivants, obtenus avec une cuve usagée dont les pointes des électrodes sont espacées d'environ 4 mm (cf. chapitre 6), sont présentés. Une séquence de 200 décharges haute tension à 10 Hz est appliquée. La température à l'intérieur de la cuve est présentée sur le graphique en Figure 49. La répartition des températures à la surface de la carte en COC à différents instants est visible sur la Figure 50.

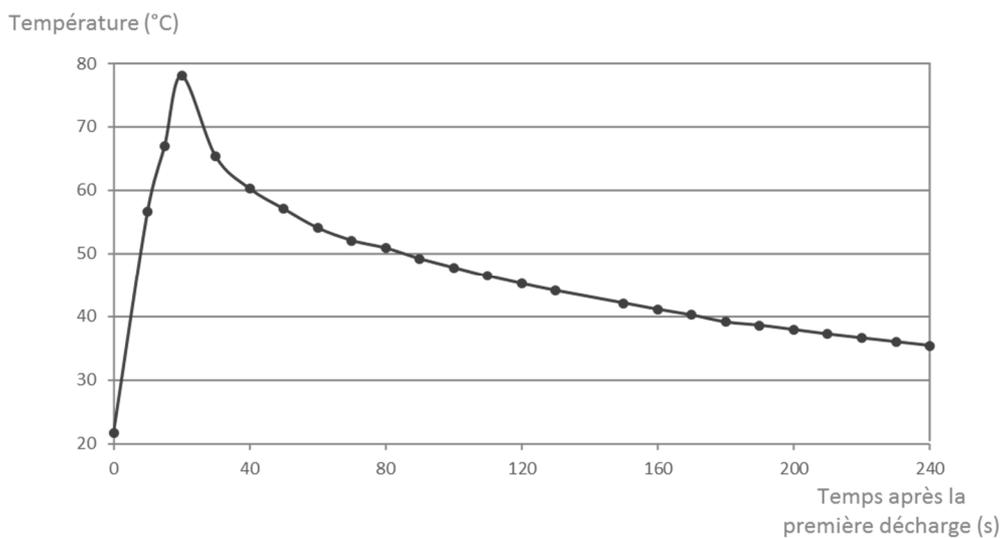


Figure 49 : Température intérieure mesurée pendant et après une séquence de 200 décharges haute tension.

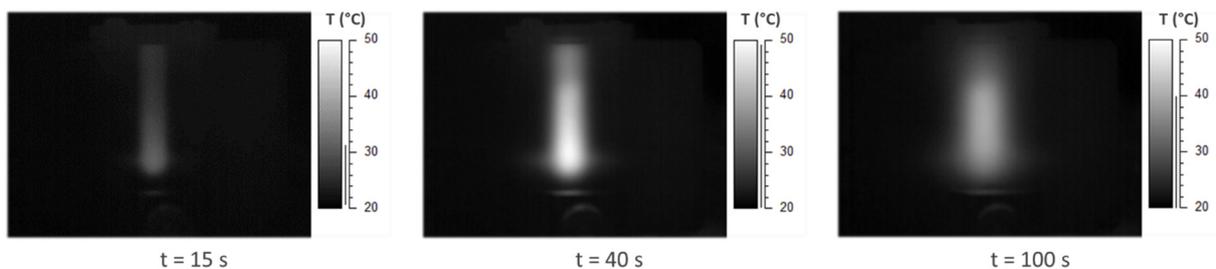


Figure 50 : Images thermiques en niveau de gris de la surface de la carte en COC à différents instants. Les 200 décharges sont déclenchées entre les temps t=0 et t=20s dans une carte favorisant l'élévation de la température.

D'après les courbes de température obtenues, l'eau atteint environ 80°C à la suite de la séquence de 200 décharges haute tension. La température intérieure augmente linéairement jusqu'à son maximum correspondant à la fin de la séquence des décharges, puis le refroidissement suit une exponentielle décroissante. La température à la surface de la cuve suit la même tendance, avec cependant un retard de quelques dizaines de secondes.

En outre sur la séquence d'images de la caméra thermique employée, il est possible d'observer que la zone de température maximale correspond au foyer des électrodes. La chaleur semble se propager autour de cette zone, la cavité contenant de l'eau restant toujours la zone la plus chaude de la cuve (la capacité thermique du COC étant plus faible que celle de l'eau).

5.2. Conclusion

Des études plus poussées concernant le vieillissement de la cuve et le contrôle de la température interne seront présentées dans le chapitre 6. En attendant, dans les chapitres suivants, nous considérerons au vu des résultats obtenus que la température de la solution peut être majorée par la valeur de 90°C ; les effets de la température seront donc testés sur des microorganismes en portant la solution à 90°C.

6. Stratégie mise en place pour la suite de l'étude

Le présent chapitre a permis de mettre en évidence les phénomènes engendrés par la décharge haute tension pouvant être à l'origine de la lyse de microorganismes. Certains d'entre eux ont d'ores et déjà été écartés dans ce chapitre. Les effets des mécanismes restants devront en revanche être évalués sur les microorganismes dans les chapitres suivants.

6.1. Mécanismes écartés pour la lyse

Au terme de ce chapitre, les mécanismes suivants ont été éliminés :

- Le champ électrique engendré est trop faible dans la plus grande partie de la cuve pour entraîner la lyse des cellules par le mécanisme d'électroporation. En outre, même dans les zones où sa valeur est élevée, sa durée d'application – quelques microsecondes – est très courte.
- Le rayonnement ultra-violet représente une part négligeable de l'énergie déposée : l'intensité du rayonnement est faible et sa durée d'émission est très courte, également de l'ordre de quelques microsecondes correspondant à la présence de l'arc électrique. Contrairement à certaines équipes comme Zupanc et col. (2013) qui utilisent une source moins éphémère, les conditions de notre étude ne permettent pas la lyse des microorganismes par l'effet du rayonnement ultra-violet.
- L'effet du cisaillement est négligeable aux échelles considérées. Les possibilités d'une lyse par déchirement des microorganismes sont donc exclues.
- L'érosion de cavitation est un phénomène trop localisé pour atteindre un nombre significatif de microorganismes présents dans la cuve en U.

6.2. Mécanismes retenus pour la lyse

Pour la suite de cette étude, les acteurs potentiels retenus sont donc :

- Les ondes de choc : elles peuvent être de différentes origines. Nous distinguons ainsi les ondes produites lors de l'apparition de l'arc électrique, celles produites lors du collapse de la bulle de vapeur, et celles produites lors du collapse des bulles du nuage de cavitation.
- Les effets du peroxyde d'hydrogène : ceux-là seront testés à une concentration de 1 mM, correspondant à la quantité de matière produite par 200 décharges haute tension dans la cuve en U remplie à mi-hauteur.
- L'échauffement : au terme d'une séquence de 200 décharges, la température du liquide peut atteindre jusqu'à environ 80°C. Les microorganismes seront d'abord chauffés à 90°C pour évaluer la contribution de la chaleur à la lyse de ceux-ci. Si des effets apparaissent, nous chercheront à déterminer une température seuil à partir de laquelle les microorganismes sont lysés.

Chapitre 4

Application de la technique de lyse sur des microalgues

Dans ce chapitre l'efficacité de la technique de lyse par des décharge haute tension précédemment décrite va être évaluée sur une première classe de microorganismes : les microalgues. Pour cela l'influence relative des effets des différents phénomènes physico-chimiques décrits dans le chapitre 3 sera soulignée. Les travaux sont conduits avec deux espèces de microalgues productrices d'huile : *Phaeodactylum tricornutum* et *Nannochloropsis gaditana*.

La recherche sur des microalgues étant une nouveauté dans le laboratoire d'accueil de cette thèse, une partie importante du travail a été de mettre en place des protocoles de caractérisation en utilisant les appareils à disposition. Ces protocoles sont décrits dans ce chapitre, avant la présentation des résultats obtenus après traitement par des décharges haute tension.

1. Matériels et méthodes

1.1. Amélioration de la cuve en U

Dans ce chapitre l'étude de la décharge haute tension dans la cuve en U est poursuivie avec des microalgues. Cette cuve présente l'avantage de confiner les effets de la décharge (cf. chapitre 2) et se rapproche d'une géométrie permettant la réflexion des ondes de choc (cf. chapitre 6). En outre, afin de conserver la solution à lyser dans la cuve malgré les fortes surpressions et jets produits lorsque les décharges sont répétées, un bouchon est ajouté. Ce bouchon est une plaque en COC de 3,15 mm d'épaisseur, traversée par deux trous de 5 mm de diamètre espacés de 16 mm. Des pas de vis M4 sont ensuite taraudés dans la carte dans laquelle la cuve a été usinée. L'étanchéité est assurée par une membrane rectangulaire d'Ecoflex® de 2 mm d'épaisseur, comprimée à l'aide de vis entre la plaque et la sortie de la cavité. L'Ecoflex est un polymère très souple commercialisé par Smooth-On préparé en mélangeant dans les proportions 1 : 1 les deux agents fournis. Après 4 heures de réticulation, un morceau rectangulaire est ensuite découpé à l'aide d'un scalpel. Lors des expériences avec des microorganismes, un film plastique Parafilm M® est ajouté entre la sortie de la cuve et le morceau d'Ecoflex®. L'assemblage final est présenté en Figure 51.

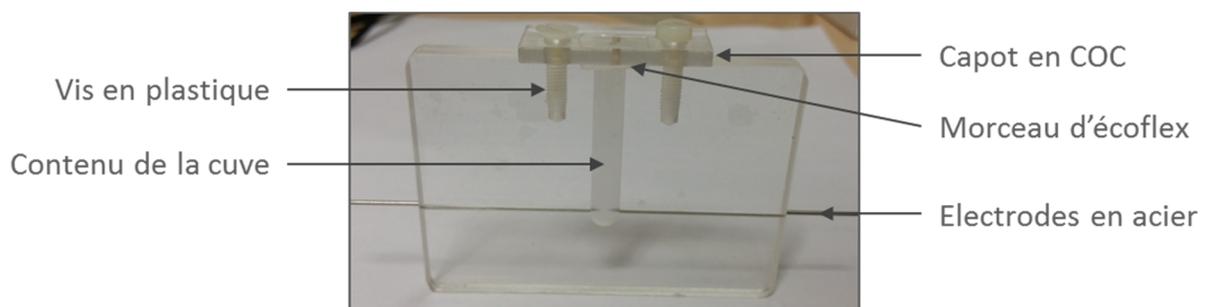


Figure 51 : Photographie annotée de la cuve en U bouchée.

1.2. Préparation des cultures de microalgues

1.2.1. Choix des souches

Deux souches d'algues sont utilisées : *Nannochloropsis gaditana* et *Phaeodactylum tricornutum*. De deux genres distincts, ces deux microalgues sont d'un grand intérêt dans le cadre de la bioproduction puisqu'elles ont la caractéristique commune de produire des lipides lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions dites « de stress » (D'Ippolito *et col.*, 2015).

Ces deux souches sont des sujets d'étude du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV) dirigé par Norbert Rolland et rattaché à la Direction de la Recherche Fondamentale (DRF) également implanté sur le site du CEA de Grenoble. La proximité géographique du LPCV a contribué à favoriser une bonne interaction avec mon laboratoire d'accueil (le Laboratoire de Biologie et d'Architecture Microfluidique dirigé par Fabrice Navarro), notamment en réduisant les temps de déplacements. Une relation fructueuse entre ces deux laboratoires s'est établie progressivement au cours du temps donnant lieu à un partenariat avec l'équipe « biogenèse, dynamique et homéostasie des lipides membranaires » dirigée par Eric Maréchal.

1.2.2. *Nannochloropsis gaditana*

L'espèce *gaditana* du genre *Nannochloropsis* est une algue d'origine marine qui peut cependant être également trouvée occasionnellement en eau douce. Elle a été décrite et répertoriée en 1980 par Hibberd. De forme quasi-sphérique, sa taille caractéristique est de quelques micromètres, typiquement entre 3 et 5 μm (cf. Figure 52). En solution, sa couleur est vert intense.

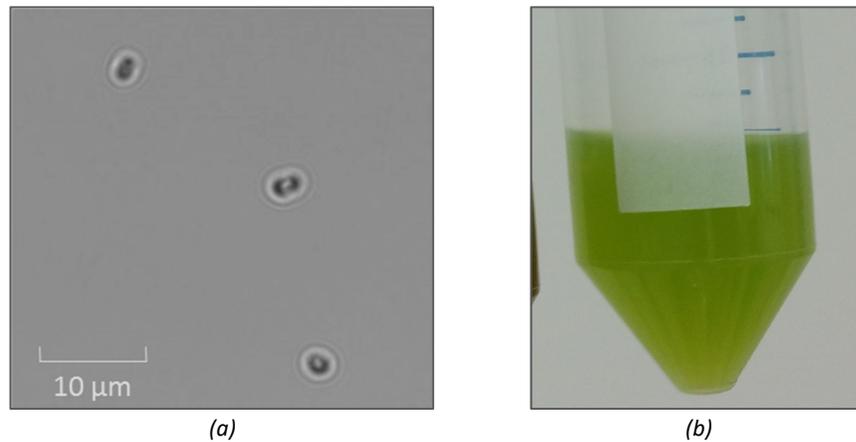


Figure 52 : (a) Photographie au microscope optique, objectif x40 ; (b) Photographie classique d'un tube contenant *Nannochloropsis Gaditana* à environ 10^7 algues/mL.

Cette algue de petite taille produit beaucoup de chlorophylle *a* (Lubián *et col.*, 2000) et peut atteindre une teneur en lipides très élevée, allant jusqu'à 68% de la masse sèche (Chisti, 2007). Ces deux caractéristiques font de *Nannochloropsis gaditana* une souche particulièrement intéressante à des fins commerciales. La souche utilisée provient de la Lagune de Oualidia au Maroc et porte la référence CCMP526. Précisons toutefois que le LPCV n'étant pas spécialisé dans la culture de cette souche, la majorité des expériences menées dans le cadre de cette thèse a été réalisée avec la souche *Phaeodactylum tricornutum*.

1.2.3. *Phaeodactylum tricornutum*

L'espèce *tricornutum* du genre *Phaeodactylum* est une algue en forme de bâtonnets répertoriée en 1897 par Bohlin. Sa longueur caractéristique est une dizaine de micromètres (cf. photographies en Figure 53). En solution, sa couleur est vert brun. La souche utilisée ici est notée *Phaeodactylum tricornutum* Pt1 (CCAP 1055/3) et décrite par De Martino *et col.* (2007). Cette microalgue a la capacité d'accumuler des lipides jusqu'à 30% de la masse sèche (Taleb, *et col.*, 2015). La souche provient de la collection « Culture Collection of Algae and Protozoa » située en Ecosse.

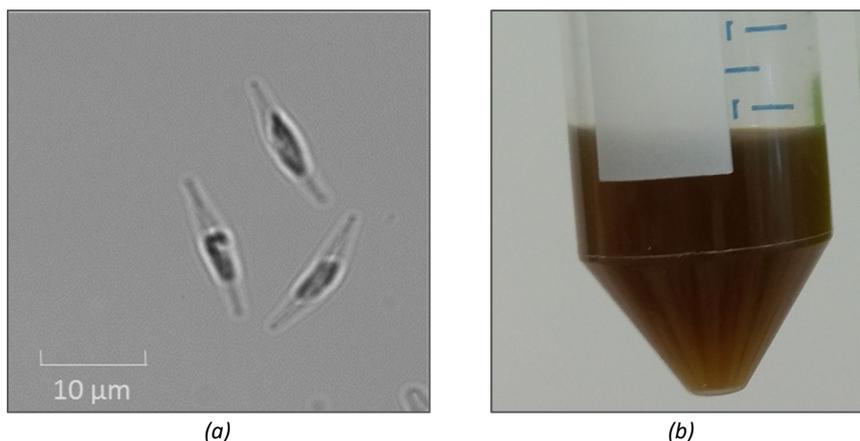


Figure 53 : (a) Photographie au microscope optique, objectif x40 ; (b) Photographie classique d'un tube contenant *Phaeodactylum tricornerum* à la concentration de 10^7 algues/mL.

1.2.4. Conditions standards de culture

Afin d'obtenir rapidement des échantillons concentrés en microalgues saines, la culture en conditions standards consiste à faire croître les microalgues dans un milieu adapté, ici une eau de mer artificielle enrichie en nutriments (ESAW pour Enriched Sea Artificial Water). Celles-ci sont cultivées en phase exponentielle dans des erlens de 250mL sous une agitation de 100 rpm (cf. Figure 54), une irradiance de $100\mu\text{E}$ et une photopériode 12 heures jour / 12 heures nuit, pendant une semaine.

Le milieu de culture est dit « concentré x10 », noté 10N10P. Ceci signifie que les concentrations en azote et en phosphate sont respectivement les suivantes :

« 10N » : $C_{\text{azote}} = 5,49 \text{ mM}$

« 10P » : $C_{\text{phosphate}} = 0,0224 \text{ mM}$

Au terme de la période de culture, les algues sont récupérées dans des tubes à fond conique et leur concentration est mesurée à l'aide d'un compteur de cellules LUNA de MokaScience.

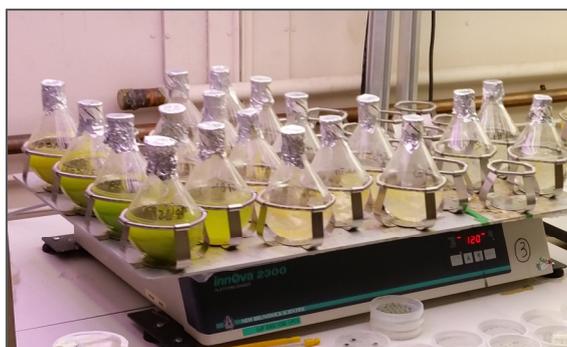


Figure 54 : Culture de microalgues : incubateur contenant des erlens en culture.

1.2.5. Conditions de culture en milieu carencé en azote

Lorsque les cultures ont atteint une densité suffisamment importante, il est possible d'accroître leur productivité en lipides en carencant le milieu de culture en azote. Cette privation entraîne un stress pour les microalgues qui produisent alors des « poches » d'huile, particulièrement visibles au microscope sur la souche *Phaeodactylum* (cf. Figure 55). Les microalgues alors affaiblies ne sont plus capables de se reproduire efficacement.

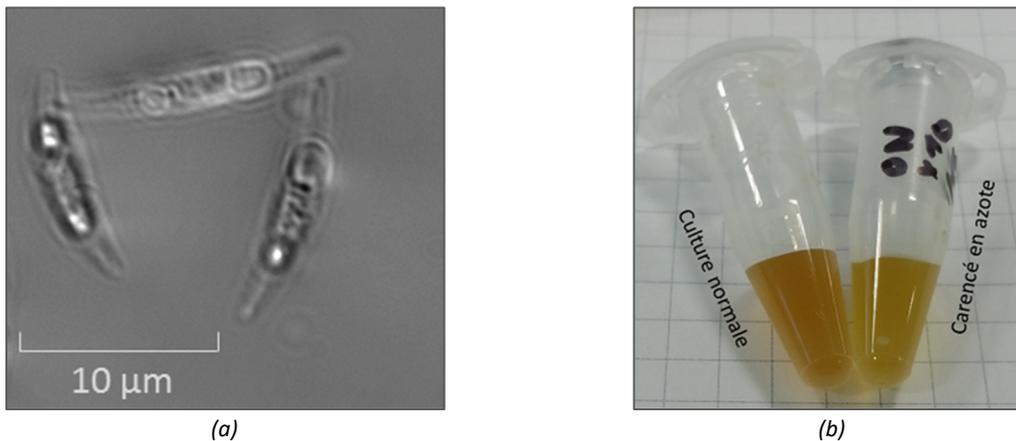


Figure 55 : (a) Photographie au microscope, objectif x40 de *Phaeodactylum* carencées en azote. Les poches blanches correspondent aux réserves de lipides dans les microalgues. (b) comparaison cultures non-carencée/carencée chez *Phaeodactylum*.

La préparation de ces cultures carencées s'effectue selon le protocole suivant conduit par l'équipe du LPCV : 50 mL de culture sont centrifugés à 3500 tours/min durant 7 min. Le surnageant est retiré puis la culture d'algues est remise en suspension dans 50 mL de milieu ESAW 00N10P. Ce cycle appelé « lavage » est effectué 3 fois avec le même temps et la même vitesse de centrifugation.

La culture est conservée dans le milieu carencé en azote pendant une durée de 5 à 10 jours selon le niveau de stress que l'on cherche à induire : plus les carences sont longues, plus le stress est important. Dans la suite de ce chapitre, les cultures carencées ont été privées d'azote pendant 7 jours.

1.3. Protocoles pour la préparation et la lyse des échantillons de microalgues

1.3.1. Modification des propriétés de la solution de microalgues

Afin de se placer dans les conditions de claquage étudiées dans le chapitre 2, les solutions de microalgues préparées par le LPCV sont diluées en sel, ce qui permet d'atteindre une conductivité proche de celle de l'eau courante. En outre les microalgues sont habituellement concentrées d'un facteur 10.

Lorsqu'une culture quitte le laboratoire partenaire, sa concentration est de l'ordre de 10^7 algues/mL ($\pm 50\%$) et l'eau de mer artificielle a une conductivité de 5 S/m. Dans un premier temps, la conductivité de la solution est abaissée à 50 mS/m (cf. Chapitre 2), une dilution par 100 de la quantité d'ions NaCl présents en solution doit donc être effectuée. Pour cela chaque tube contenant 50 mL de solution de microalgues est centrifugé 10 min à 3900 g, puis 45 mL de surnageant sont remplacés par 45 mL d'eau ultra-pure, de conductivité mesurée proche de 1 mS/m considérée comme négligeable devant celle recherchée. La conductivité de la solution initiale a alors été divisée par 10. L'opération est effectuée une seconde fois, et la conductivité de la solution est ainsi abaissée jusqu'à 50 mS/m.

Les microalgues sont ensuite concentrées d'un facteur 10. Les tubes de 50 mL sont centrifugés pendant 10 min à 3900 g. Les algues sont rassemblées au fond du tube dans un culot, puis 45 mL de surnageant sont retirés du tube. Les 5 mL de solution obtenues contiennent donc des algues à une concentration d'environ 10^8 algues/mL ($\pm 50\%$) et de conductivité proche de 50 mS/m.

De plus des expériences ont été menées pour étudier l'impact de la concentration en microalgues. Pour celles-là, la concentration initiale de chaque échantillon, légèrement variable au terme de la

période de culture, est ajustée pour être précisément égale à $3,5 \times 10^8$ cellules/mL ($\pm 15\%$). Pour cela un volume adapté de surnageant est retiré de façon à obtenir une concentration de $3,5 \times 10^8$ algues/mL.

1.3.2. Traitement par décharges haute tension

De la même façon que dans les chapitres précédents, les manipulations sont effectuées dans une salle grise (ISO 5) dont la température, la pression et le taux d'humidité sont maintenus constants respectivement à 21°C, 1013 hPa et 50%.

La carte préparée est tenue à l'aide d'un support avec vis fixé sur une table optique. La haute tension est délivrée à la cuve par le générateur décrit dans le chapitre 2. La tension et l'intensité du courant au niveau des électrodes de décharge sont mesurées et enregistrées à l'aide d'un oscilloscope numérique Picoscope 3404A. Les impulsions haute tension ont pour caractéristiques typiques : une durée de 30 μ s, une amplitude de 10 kV et sont répétées à une fréquence de 10 Hz.

Le volume désiré d'échantillon est introduit à l'aide d'une propipette dans la cuve. La cuve est ensuite bouchée comme expliqué dans le paragraphe 1.1 et les décharges électriques sont produites au sein de la cuve. L'échantillon est à la fin de ce traitement prélevé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 0,6 mm de diamètre, suffisamment fine pour éviter d'abîmer les pointes des électrodes par frottement.

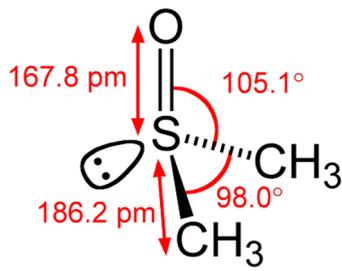
1.3.3. Traitement des microalgues par chauffage et eau oxygénée

Au cours des expériences menées sur les microalgues, les échantillons sont chauffés afin de tester les effets de l'apport de chaleur lors des décharges électriques. Les effets de l'eau oxygénée sont également étudiés, à partir des résultats obtenus dans le chapitre 3.

Lors du chauffage des microalgues, 200 μ L de solution contenant les microalgues sont déposés dans un microtube de 2 mL. Ce microtube est ensuite plongé à la verticale pendant 25 min dans un bain-marie à 95°C. Le traitement à l'eau oxygénée s'effectue également dans un microtube de 2 mL. 180 μ L de solution contenant les microalgues sont déposés dans le microtube puis centrifugés 1 minute à 2000 g à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse Labnet C-1200. 20 μ L d'une solution d'eau oxygénée à 10 mM sont ensuite ajoutés dans le microtube. L'étape de centrifugation permet ici de diluer progressivement la solution d'eau oxygénée à 10 mM dans le surnageant, avant de rencontrer les microalgues.

1.4. Ouverture des microalgues à l'aide du diméthylsulfoxyde

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est une molécule polaire amphiphilique souvent utilisée comme solvant organique. A une concentration en solution proche de 20% le DMSO a la propriété de favoriser l'insertion du colorant Rouge de Nil dans les cellules pour mettre en évidence les lipides qu'elles contiennent (cf. paragraphe 1.5.2). Lorsque sa concentration augmente, le DMSO entraîne la destruction complète de la membrane de la microalgue libérant alors ses organites dans la solution (cf. Figure 56).



(a)

Concentration en DMSO (% mol)	Effets
0 – 10 %	Amincissement de la membrane
10 – 20 %	Amincissement de la membrane et formation de pores transitoires
20 – 100 %	Formation de pores permanents et désintégration de la membrane

(b)

Figure 56 : Caractéristiques du diméthylsulfoxyde : (a) Représentation de Cram de la molécule, (b) Effets sur une membrane phospholipidique en fonction de la concentration molaire en DMSO (à partir des travaux de Gurtovenko & Anwar, 2007).

Au cours des caractérisations qui suivent, le mélange de la solution aqueuse de microalgues avec le DMSO se fait dans des proportions qui dépendent de l'application visée :

- **4 : 1** quand on cherche uniquement à mettre en évidence la présence de lipides à l'aide du rouge de Nil : généralement 20 μ L du mélange DMSO + rouge de Nil dans 80 μ L de la solution contenant les microalgues.
- **1 : 1** quand on cherchera à extraire la chlorophylle des microalgues : généralement 150 μ L de DMSO dans 150 μ L de la solution contenant les microalgues.

1.5. Protocoles d'analyse des échantillons

Afin de pouvoir accéder simplement et rapidement aux informations recherchées, il a été choisi d'effectuer des mesures optiques pour caractériser l'échantillon. Les propriétés optiques de l'échantillon sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque Tecan M1000 (cf. Figure 57), capable d'enregistrer des spectres d'absorbance et de fluorescence.

Deux types de mesures peuvent être effectuées avec cet instrument :

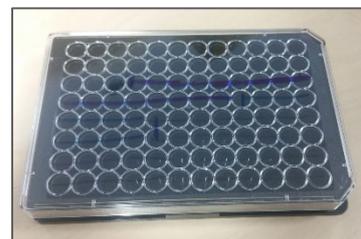
- Des mesures d'absorbance, permettant de mettre en évidence la présence de chlorophylle (cf. paragraphe suivant),
- Des mesures de fluorescence, révélant la présence de lipides dans l'échantillon à l'aide d'un fluorochrome adapté (cf. paragraphe 1.5.2).



(a)



(b)



(c)

Figure 57 : Mesures optiques à l'aide du lecteur de plaque (a) Tecan M1000. (b) plaque transparente pour les mesures d'absorbance, (c) plaque opaque pour les mesures de fluorescence.

1.5.1. Absorbance de la chlorophylle

La souche *Phaeodactylum tricornutum* contient entre autres pigments, les trois formes de chlorophylle suivantes : *a*, *c1* et *c2* (Carreto & Catoggio, 1976). Les structures de ces pigments (cf. Figure 58) leur donnent la propriété d'absorber la lumière autour de 430 et 670 nm pour la chlorophylle *a* (Owens & Wold, 1986), et 580 nm et 630 nm pour les pigments de chlorophylle *c1* et *c2* (Carreto & Catoggio, 1976).

La souche *Nannochloropsis gaditana* contient également de la chlorophylle *a* (Lubián *et col.*, 2000) mais elle ne renferme pas une quantité significative de pigments de chlorophylle *c*.

La chlorophylle *a* présente chez les deux espèces apparaît comme un élément facile à quantifier en solution par absorbance afin d'estimer un niveau d'extraction. Cependant le pic d'absorbance à 430 nm de la chlorophylle *a* est à la fois :

- susceptible de se superposer avec le domaine d'absorbance de la fucoxanthine,
- proche des limites techniques du lecteur de plaque TECAN qui présente en absorbance un bruit fort pour les longueur d'onde inférieure à 420 nm dans les conditions classiques d'utilisation.

Il ne sera donc pas utilisé pour caractériser le taux d'ouverture des microalgues étudiées, malgré son amplitude importante. En revanche, le deuxième pic de la chlorophylle *a* placé à 670 nm permet de s'affranchir des problèmes mentionnés précédemment et semble donc être un bon candidat pour caractériser le taux d'ouverture des microalgues.

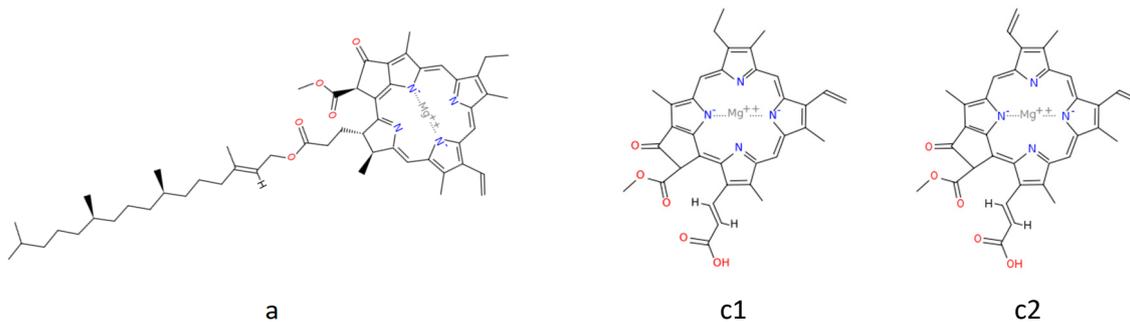


Figure 58 : Structure chimique des trois pigments de chlorophylle présentés.

Le principe de la mesure à partir de l'absorbance de la chlorophylle est d'enregistrer la valeur de l'amplitude du pic à 670 nm associé à la chlorophylle *a*. Cette mesure est effectuée dans le surnageant d'un échantillon dans lequel la chlorophylle issue de la microalgue a été dissoute. La valeur de l'amplitude du pic donne, après vérification par une courbe d'étalonnage, la teneur en chlorophylle de l'échantillon étudié (Mackinney, 1941).

La centrifugation d'un échantillon contenant des microalgues permet de ne conserver dans la solution que les espèces dissoutes et éventuellement d'autres phases liquides, car toutes les particules solides, issues par exemple de débris cellulaires, sont concentrées au fond du microtube. La détection de composés libérés en solution après un traitement est donc systématiquement précédée d'une centrifugation à 3900 g pendant 4 min à l'aide d'une centrifugeuse Sigma 3-16K. Le surnageant de chaque échantillon est récupéré avec une pipette et analysé à l'aide du lecteur de plaque spectrophotomètre Tecan M1000.

Les mesures sont effectuées dans les plaques à puits (cf. Figure 57-b). Chaque puits à analyser est rempli de 100 µL de solution (sauf dans les cas précisés où le volume d'échantillon traité est trop faible). Le spectre est ensuite généralement enregistré dans toutes les longueurs d'onde du visible, c'est-à-dire de 400 nm à 800 nm, avec une valeur par pas de 2 nm. Dans certains cas, seules les valeurs autour de 670 nm (de 660 nm à 680 nm) sont mesurées. Le stockage et le traitement des données acquises s'effectue directement sur un ordinateur.

1.5.2. Mesure de la fluorescence du rouge de Nil

La présence de lipides dans un échantillon liquide peut être mise en évidence à l'aide du colorant rouge de Nil (Nile Red, abrégé NR, en anglais). Dissout dans un solvant adapté, ce colorant a la propriété d'émettre un rayonnement de fluorescence lorsqu'il est à proximité d'un corps lipidique. Le rouge de Nil se fixe sur les molécules de triacylglycerols issues par exemple de microalgues (Rumin et al., 2015).

Le protocole mis en place par Held & Raymond (2011) consiste à dissoudre du rouge de Nil dans le diméthylsulfoxyde (cf. paragraphe 1.4) et à utiliser cette solution pour faire fluorescer l'échantillon s'il contient des lipides.

Commercialisé sous forme de poudre, le rouge de Nil est d'abord dissout à 1 mg/mL dans un solvant organique adapté, le DMSO, pour former un échantillon « stock maître ». Le tube contenant le mélange est enveloppé dans du papier d'aluminium afin de protéger les fluorochromes de la lumière ambiante. Ce tube est conservé à température modérée (entre 6 et 20°C). Un échantillon « stock de travail » est ensuite préparé en diluant l'échantillon « stock maître » par 400 dans le DMSO. Le tube est également enveloppé dans du papier d'aluminium. Ce « stock de travail », qui sera utilisé dans toutes les expériences suivantes, contient donc du Rouge de Nil dans du DMSO à une concentration de 2,5 µg/mL.

La mesure de fluorescence est effectuée dans une plaque 96 puits opaque (Figure 57-c). Dans chaque puits, 80 µL de l'échantillon à analyser est introduit, accompagné de 20 µL de rouge de Nil à 2,5 µg/mL. La concentration finale en rouge de Nil dans un puits est donc de 0,5 µg/mL.

Le DMSO dans lequel le rouge de Nil a été dilué traverse les membranes des cellules. Ainsi lorsqu'un échantillon contenant de l'huile est introduit en présence de rouge de Nil dissout dans le DMSO, l'échantillon fluoresce indifféremment selon que l'huile est située à l'intérieur ou à l'extérieur de la microalgue. Deux situations sont alors à distinguer selon la mesure que l'on souhaite effectuer :

- Lorsque la quantité d'huile totale de l'échantillon doit être mesurée, le niveau de fluorescence de celui-ci est mesuré dans un puits accompagné de rouge de Nil.
- Lorsque la seule quantité d'huile libérée dans la solution doit être mesurée, seul le surnageant de l'échantillon doit être considéré. Les cellules qui n'ont pas été ouvertes et qui contiennent encore des lipides sont alors concentrées dans un culot à la suite d'une étape de centrifugation similaire à celle décrite pour la mesure de l'absorbance en 1.5.1.

La mesure de fluorescence s'effectue également à l'aide du spectrofluoromètre Tecan M1000. Suite à une étude du spectre de fluorescence (cf. 2.1.2), le rayonnement d'excitation est émis à 530 nm avec une fenêtre de 10 nm de large. La lecture s'effectue entre 550 nm et 700 nm avec un pas de 2 nm. Le pic de fluorescence caractéristique du rouge de Nil en présence de lipides dans le DMSO apparaît entre 580 et 590 nm.

2. Validation des protocoles

L'étude de microalgues menée au cours de cette thèse étant une nouveauté dans le laboratoire d'accueil, les protocoles expérimentaux décrits précédemment ont été validés afin de pouvoir interpréter correctement les résultats obtenus à la suite d'une lyse par des décharges haute tension.

2.1. Validation des méthodes de caractérisation optique

2.1.1. Ouverture des microalgues par le DMSO

Pour extraire le contenu des microalgues à l'aide du DMSO, le mélange solution de microalgues/DMSO est dans les proportions **1 : 1**.

2.1.1.1. Action du DMSO

La solution de microalgues est mise au contact du DMSO dans un microtube de 2 mL. L'action du DMSO sur les microalgues se manifeste en moins d'une minute par un léger changement de couleur : la solution verdit et un échauffement de la solution se produit.

Après 4 minutes de centrifugation à 3900 g il est possible d'observer à l'œil nu la couleur du surnageant dont la couleur verte est caractéristique de la présence de chlorophylle. Cette simple observation permet de mettre en évidence la libération de la chlorophylle hors du cytoplasme délimité par la membrane de la microalgue, mais également hors des chloroplastes dont la « membrane » lipidique a également été brisée. Notons que si la chlorophylle avait été maintenue dans les chloroplastes, elle aurait alors été retenue dans le culot formé lors de la centrifugation.

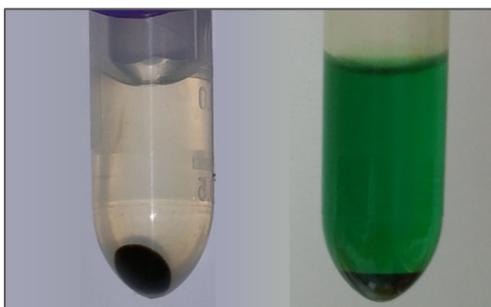


Figure 59 : Photographies des solutions de *Phaeodactylum* après centrifugation : à gauche sans DMSO, à droite en présence de DMSO dans les proportions **1 : 1**.

2.1.1.2. Spectre d'absorption

La coloration verte du surnageant obtenue par l'action du DMSO sur les microalgues peut être analysée à l'aide du spectrophotomètre TECAN décrit en section 1.5.1. En analysant la lumière ayant traversée les deux surnageants présentés en Figure 59 à partir d'une souche de *Phaeodactylum tricornutum*, les spectres d'absorption en Figure 60 sont obtenus. Les positions des différents pics d'absorbance associés à la présence de chlorophylle dans l'échantillon traité par le DMSO y sont précisées.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues

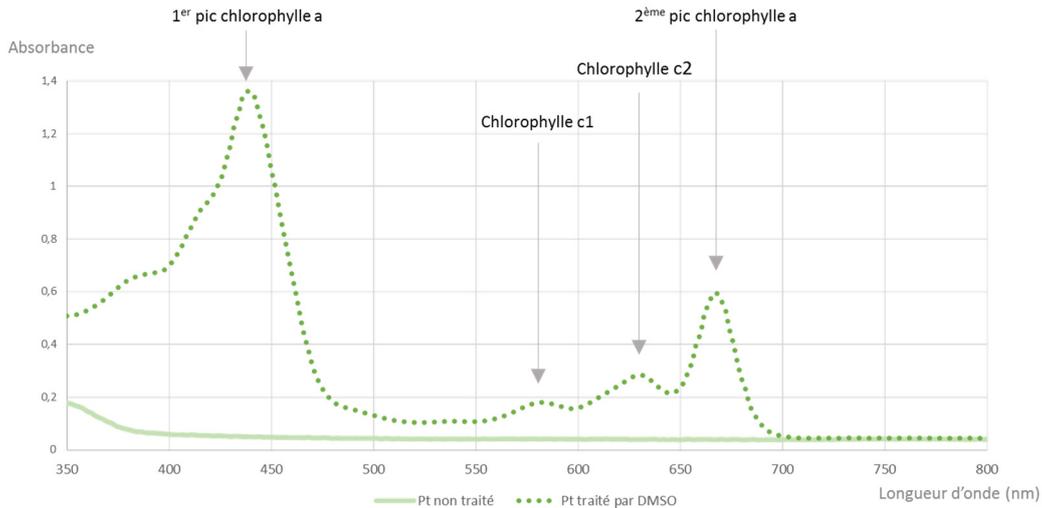


Figure 60 : Spectres d'absorption des surnageants de solutions de *Phaeodactylum* traitée et non traitée par le DMSO.

Le même type de spectres peut être obtenu à partir de la souche *Nannochloropsis gaditana*, avec cependant comme annoncé dans la section 1.5.1 des pics d'absorbance associés à la chlorophylle c beaucoup plus faibles, voire absents. Les courbes sont présentées en Figure 61.

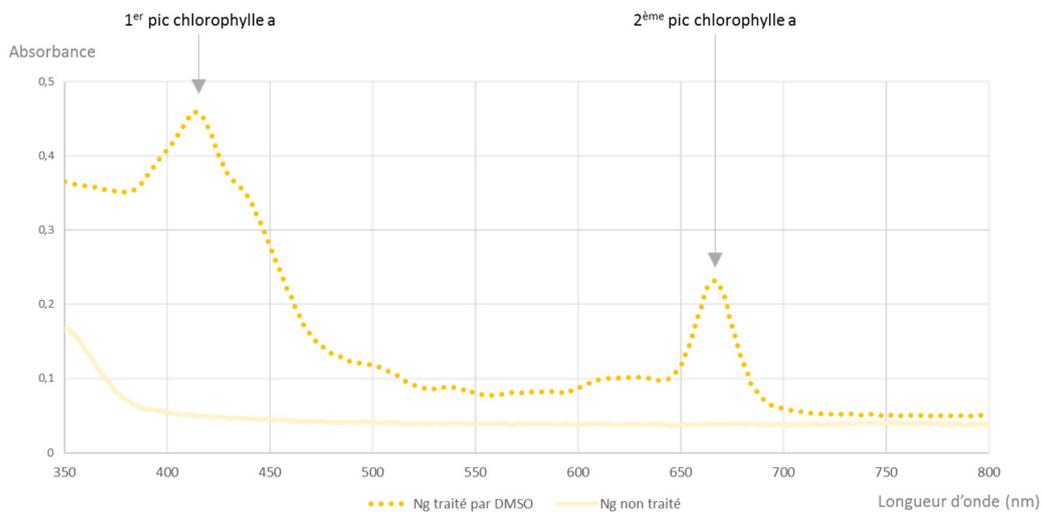


Figure 61 : Spectres d'absorption des surnageants de solutions de *Nannochloropsis* traitée et non traitée par le DMSO.

Comme annoncé dans le paragraphe 1.5.1, l'amplitude du pic associé à l'absorbance de la chlorophylle a peut être correctement mesurée chez les deux espèces de microalgues étudiées. Les calculs de rendement d'extraction se feront donc à partir de l'absorbance autour de 670 nm lors des manipulations avec *Phaeodactylum* et *Nannochloropsis*.

2.1.1.3. Résistance de la chlorophylle au DMSO

La lyse par voie chimique à l'aide du DMSO est alors considérée comme référence dans la suite de cette étude. Toutefois avant de continuer, il est nécessaire d'observer l'évolution temporelle de l'intensité du pic d'absorbance de la chlorophylle a en présence de DMSO, qui pourrait être soupçonné de dégrader la chlorophylle.

Moins d'une minute après centrifugation du mélange d'une solution de *Phaeodactylum* avec du DMSO en proportion 1 : 1, le spectre d'absorbance du surnageant de l'échantillon a été enregistré avec un

pas de temps régulier de 15 minutes. L'amplitude du pic d'absorbance à 670 nm est retenue pour chaque mesure et son évolution est présentée en Figure 62.

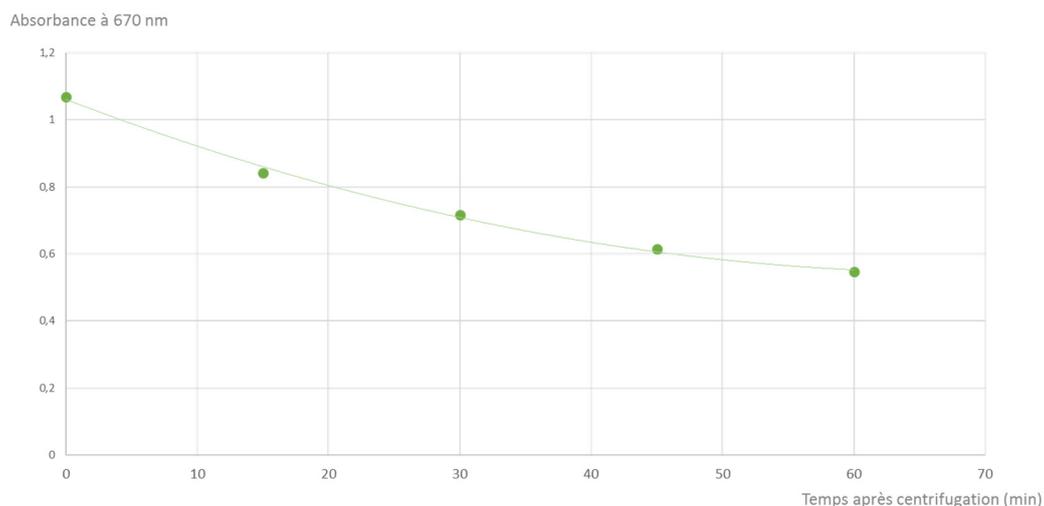


Figure 62 : Evolution temporelle de l'absorbance à 670 nm du surnageant d'un mélange *Phaeodactylum*/DMSO en proportion 1 : 1.

La courbe obtenue montre une décroissance de l'absorbance à 670 nm du surnageant assez rapide puisque son amplitude chute de 21% en 15 minutes. Ce résultat ajoute donc une contrainte supplémentaire lors des manipulations : les mesures d'absorbance des échantillons lysés avec le DMSO doivent être effectuées le plus rapidement possible. En pratique, le DMSO sera donc introduit au dernier moment avant la centrifugation et la mesure d'absorbance sera effectuée immédiatement à la sortie de la centrifugeuse.

2.1.2. Fluorescence du rouge de Nil en présence d'huile

2.1.2.1. En présence d'huile de Colza

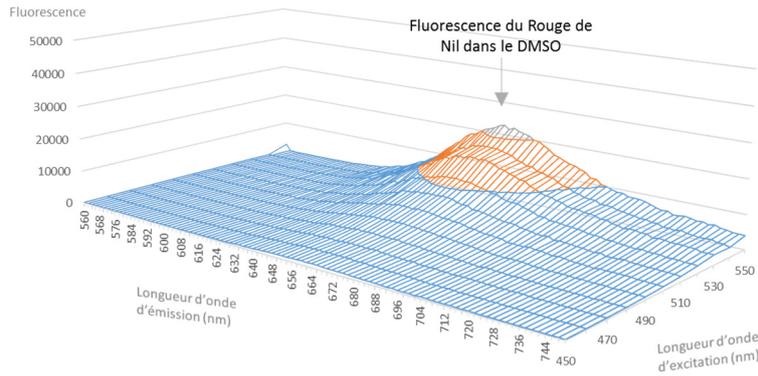
Une première expérience est effectuée afin de vérifier si le rouge de Nil réagit comme prévu en présence d'huile. Pour cela 1 μL d'huile de Colza est introduit dans un mélange de 79 μL d'eau et 20 μL de rouge de Nil dans du DMSO (selon le protocole décrit en section 1.5.2).

Le spectre émis par l'échantillon est enregistré pour différentes longueurs d'onde. Les résultats obtenus en présence et en l'absence d'huile dans la solution sont présentés en Figure 63.

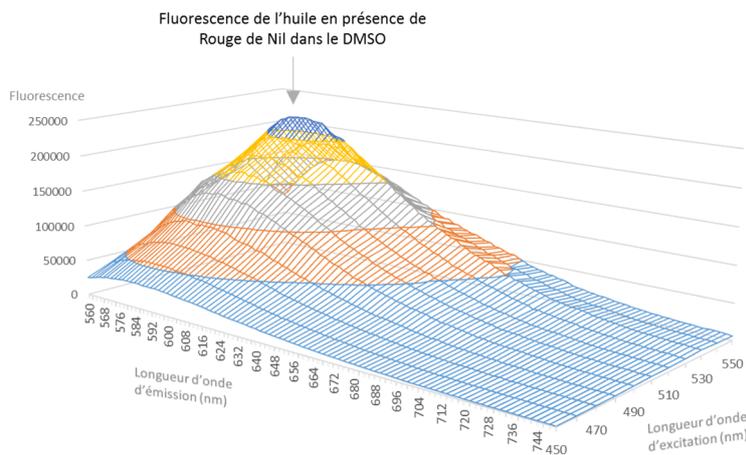
Sur les graphiques obtenus, nous pouvons voir qu'en présence d'huile de Colza, l'échantillon fluoresce dans le rouge de Nil comme attendu. Deux couples de fluorescence sont mis en évidence :

- (540 nm/670 nm) associé à la fluorescence intrinsèque du Rouge de Nil dans le DMSO. Il est à noter que sur le graphique b la concentration en huile dans le mélange est trop importante pour observer le pic de fluorescence intrinsèque du Rouge de Nil DMSO car son amplitude est faible devant celle du pic associé à la fluorescence de l'huile.
- (530 nm/590 nm) associé à la présence d'huile de Colza dans le DMSO.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues



(a) Sans huile



(b) En présence de 1% d'huile de Colza en volume

Figure 63 : Réponse des échantillons à différentes longueurs d'onde d'excitation en présence de Rouge de Nil dans le DMSO avec et sans huile.

2.1.2.2. En présence de lipides dans une souche de microalgues

La fluorescence du rouge de Nil en présence d'huile de Colza étant validée, la mesure est reproduite avec des échantillons contenant des microalgues. La Figure 64 présente les résultats obtenus avec deux cultures de *Nannochloropsis*. Le graphique (a) représente les niveaux de fluorescence d'une première culture développée dans des conditions dites « normales » ; le graphique (b) représente la fluorescence d'une seconde culture développée dans des conditions dites « de stress » en imposant une carence en azote (cf. section 1.2.5).

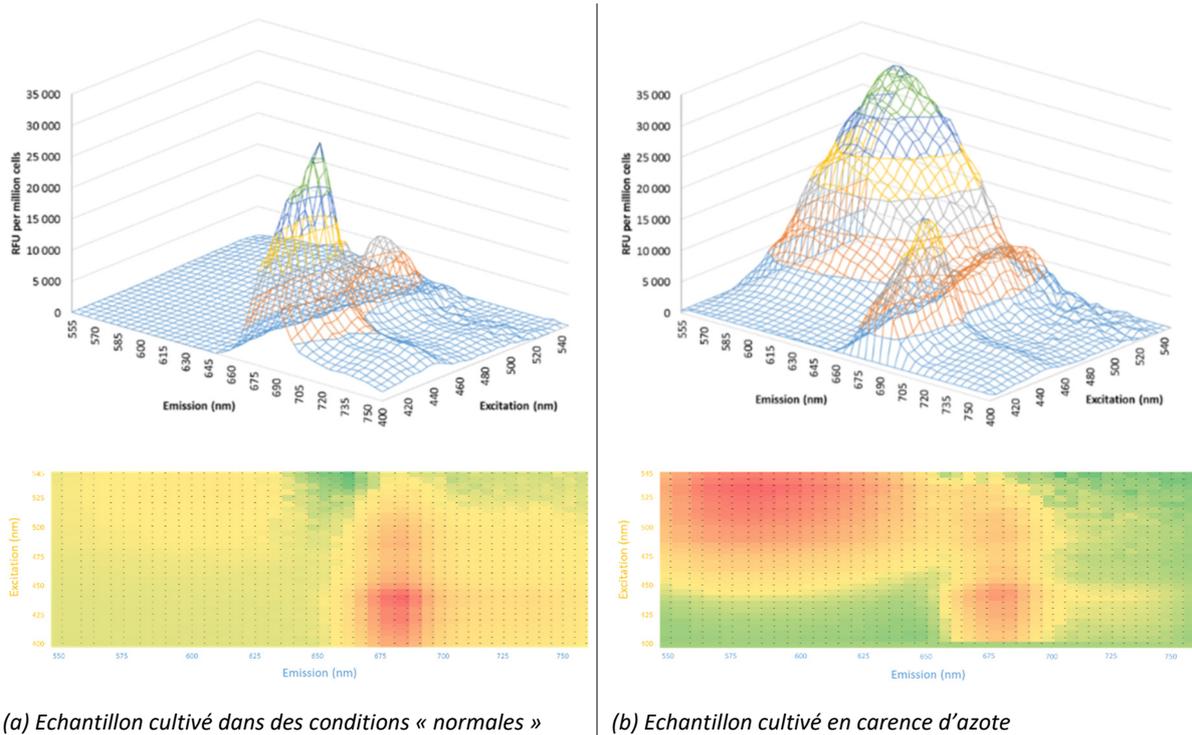


Figure 64 : Réponse des échantillons contenant des microalgues du genre *Nannochloropsis* en présence de rouge de Nil.

Les graphiques obtenus permettent d'identifier plusieurs couples (excitation/émission) d'intérêt :

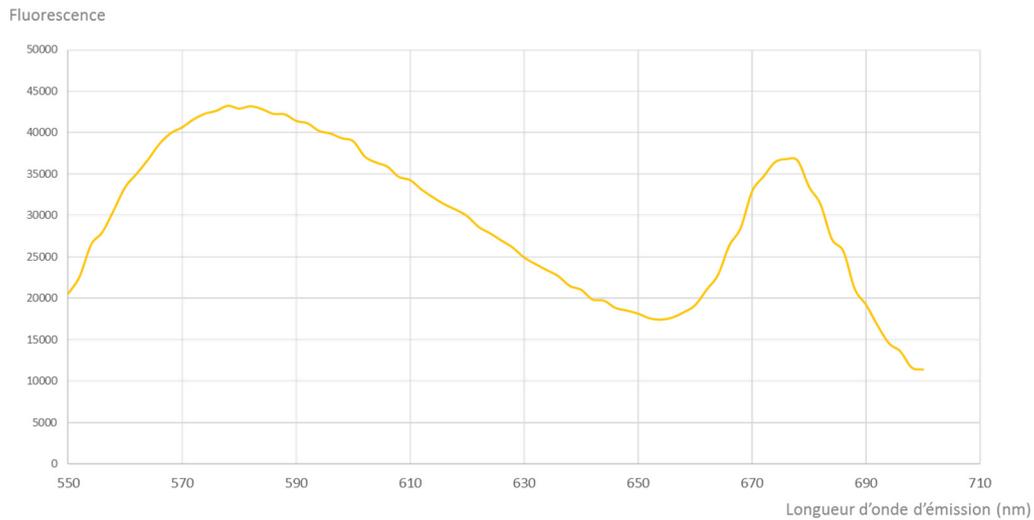
- Le couple (540 nm/680 nm) correspond, comme prévu, à la fluorescence intrinsèque du rouge de Nil en présence de DMSO.
- Le couple (530 nm/590 nm) correspond, comme prévu également, à la fluorescence du rouge de Nil en présence d'huile. Ce pic de fluorescence est présent pour l'échantillon carencé en azote, mais absent lorsque l'échantillon est cultivé dans des conditions « normales ». Cette observation est également en accord avec les attentes : les microalgues accumulent des quantités significatives d'huile lorsqu'elles sont cultivées en conditions de stress.
- Le couple (440 nm/680 nm) apparaît. Cette fluorescence est caractéristique de la chlorophylle contenue dans les microalgues étudiées. Il est à noter que l'intensité de cette fluorescence est plus faible pour l'échantillon cultivé en condition de stress. Le développement de la microalgues étant fortement altéré en l'absence d'azote, cette observation n'est pas surprenante.

Le but de cette étude étant de quantifier l'huile présente dans l'échantillon, le couple (excitation/émission) d'intérêt est celui associé à la fluorescence de l'huile dans le DMSO, c'est-à-dire le couple (530 nm/590 nm). Par la suite, les mesures sont effectuées avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm.

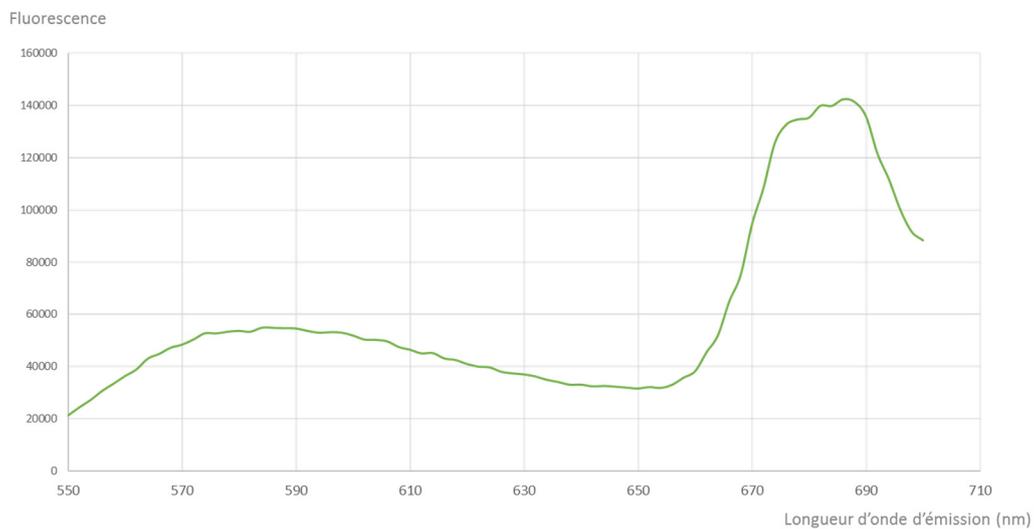
2.1.2.3. Comparaison entre les deux souches de microalgues carencées

Il est maintenant possible de comparer les capacités de production de lipides des deux souches sélectionnées, *Nannochloropsis* et *Phaeodactylum* via leurs niveaux respectifs de fluorescence. Deux courbes type de fluorescence d'échantillons carencés sont présentées en Figure 65.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues



(a)



(b)

Figure 65 : Courbe de fluorescence suite à une excitation à 530 nm d'un échantillon contenant (a) une souche de *Nannochloropsis carencée* (b) une souche de *Phaeodactylum carencée*.

Afin d'avoir le maximum d'amplitude, le gain de l'appareil est adapté pour chaque échantillon. Par conséquent ces deux courbes ne peuvent être comparées qu'en valeur relative. La comparaison s'effectue entre le pic à 590 nm associé à la présence d'huile et le pic de fluorescence à 680 nm associé à la présence du rouge de Nil, introduit en même quantité dans les deux échantillons et servant ici de référence.

Comme attendu d'après les capacités respectives de production de lipides de ces deux souches (cf. sections 1.2.2 et 1.2.3), l'intensité relative de la fluorescence à 590 nm \pm 10 nm est plus importante pour la souche *Nannochloropsis* que pour *Phaeodactylum*.

Les méthodes de détection de la chlorophylle et des triglycérides ayant pu être mises au point et validées, celles-ci peuvent être désormais employées pour la caractérisation des cultures d'algues. Ces méthodes serviront dans la suite de ce rapport pour caractériser soit un échantillon de microalgues non traité, soit un échantillon traité (par décharges électriques, par agents chimiques, par apport de chaleur par exemple).

2.2. Vérification des relations entre les concentrations d'intérêt et les mesures optiques

Les deux types de mesures présentées précédemment sont étalonnées afin de déterminer une relation entre les caractéristiques optiques et les concentrations en molécule d'intérêt : chlorophylle et lipides.

2.2.1. Relation entre l'absorbance et la concentration en chlorophylle a

Afin d'obtenir une relation entre l'absorbance de la solution et la concentration en chlorophylle a , une solution « mère » de microalgues issues de la souche *Phaeodactylum* est diluée plusieurs fois dans l'eau. En se rapportant à la concentration de cette solution mère, les dilutions successives ont pour concentrations relatives 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 et 0,05 correspondant respectivement à des dilutions par 4/3 ; 2 ; 4 ; 8 et 20. Les solutions de microalgues sont ensuite mélangées avec du DMSO en proportion 1:1. On considère alors que les concentrations en chlorophylle a des solutions obtenues suivent le même rapport de dilution par rapport à la solution mère. La courbe obtenue en traçant l'absorbance de la solution en fonction de sa concentration par rapport à la solution mère est présentée en Figure 66.

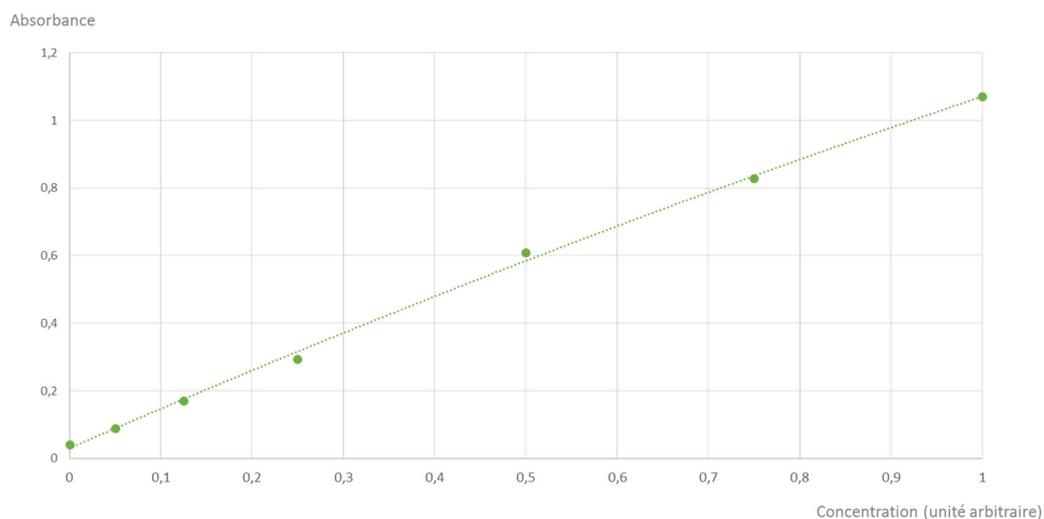


Figure 66 : Amplitude du pic d'absorbance à 670 nm en fonction de la concentration en microalgues avec une souche *Phaeodactylum*.

A partir des points expérimentaux, il est possible de tracer une droite avec un très bon coefficient de régression ($R^2 = 0,999$). La relation entre la concentration en chlorophylle a et l'absorbance à 670 nm de la solution peut donc être considérée comme linéaire. Les concentrations relatives en chlorophylle a de différentes solutions peuvent donc être déduites.

Pour la suite des expériences, les mesures d'absorbance semblent être un bon indicateur du niveau de chlorophylle a dans la solution. Ces mesures permettent de calculer un taux de libération de la chlorophylle lors du traitement par décharges haute tension.

2.2.2. Relation entre la fluorescence et la concentration en lipides

De manière similaire, la relation entre la fluorescence de la solution et sa concentration en lipides est présentée dans ce paragraphe. Pour cela, une solution mère de microalgues carencées en azote est diluée. Les solutions obtenues sont ensuite mélangées à une solution de DMSO contenant du rouge de Nil et leur niveau fluorescence est mesuré.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues

La fluorescence de la solution en fonction de sa concentration par rapport à la solution mère est présentée en Figure 67. Il apparaît que cette relation n'est pas linéaire comme le prouve le graphique dans lequel la concentration est tracée en échelle logarithmique ; la concentration suit donc une évolution exponentielle en fonction de la fluorescence.

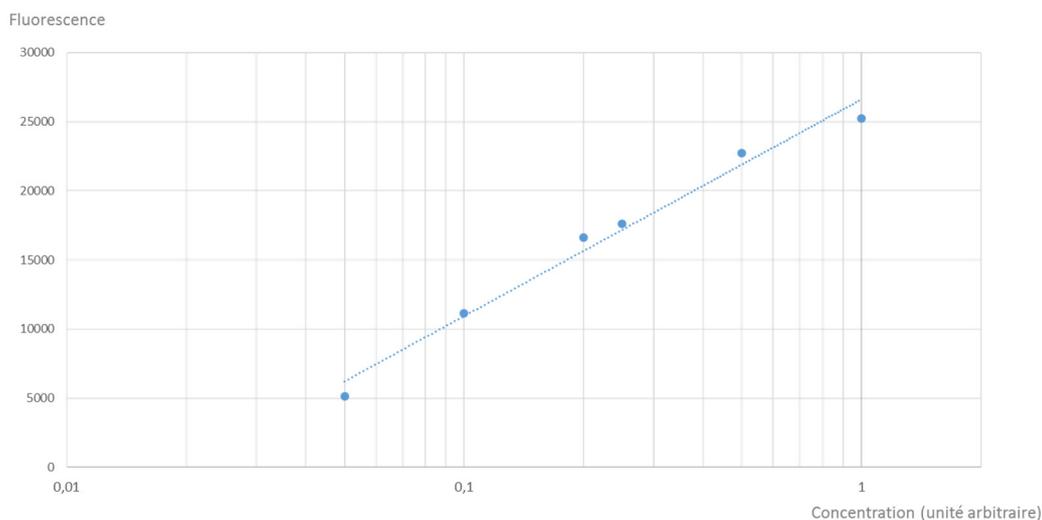


Figure 67 : Amplitude du pic de fluorescence à 580 nm en fonction de la concentration en microalgues avec une souche de *Phaeodactylum* carencée en azote.

2.3. Rendements d'extraction après traitement par des décharges haute tension : validation de la méthode

2.3.1. Caractérisation des surnageants

Ce premier test permet de vérifier si la méthode de caractérisation optique est compatible avec le traitement par les décharges haute tension. Un premier ordre de grandeur du taux d'ouverture atteignable par le traitement par impulsions peut alors éventuellement être calculé.

Une solution de microalgues (180 μ L) de *Phaeodactylum tricornutum* carencées en azote est introduite dans la cuve puis traitée par 200 décharges. Après traitement et centrifugation, les spectres d'absorbance et de fluorescence du surnageant sont enregistrés selon les protocoles décrits précédemment. Des lipides et de la chlorophylle sont alors observés en solution. Ce premier test est d'une grande importance puisque les composés recherchés sont bien libérés en solution lors du traitement par décharges haute tension. La technique de lyse étudiée semble donc adaptée aux microalgues.

Les courbes d'étalonnage obtenues (cf. Figure 66 et Figure 67) permettent de comparer les quantités de chlorophylle et de lipides détectés dans le surnageant après traitement par décharges haute tension avec les quantités totales présentes dans l'échantillon (cf. paragraphe 1.4). Les résultats obtenus diffèrent de façon importante selon le composé recherché : environ 30% de libération avec la chlorophylle et 8% avec les lipides.

Dans la suite de ce chapitre, les caractérisations seront effectuées par mesure de l'absorbance de la solution autour de la longueur d'onde d'absorption de la chlorophylle a . L'hydrophobicité des lipides potentiellement extraits des microalgues ne semble pas compatible avec le protocole de quantification fondé sur l'utilisation du rouge de Nil. De plus la non-linéarité de la relation entre la concentration en lipides et la fluorescence de la solution complexifie les calculs de rendements et ajoute une erreur

significative liée à l'étalonnage de la courbe de référence. Des techniques pour quantifier correctement ces lipides seront toutefois évoquées en fin de chapitre.

2.3.2. Résistance de la chlorophylle au traitement

Les phénomènes engendrés par la décharge haute tension ont permis de libérer de la chlorophylle et des lipides en solution : certaines membranes de la microalgues ont donc nécessairement été affectées par le traitement. Avant de continuer l'étude fondée sur la quantification de la chlorophylle libérée en solution, il est important de vérifier que ce composé n'est pas également dégradé lors du traitement.

Pour cela, l'expérience suivante est menée : un échantillon de microalgues de la souche *Phaeodactylum* cultivée en conditions standards est traité par 200 décharges ; la solution obtenue est ensuite centrifugée pour concentrer les débris cellulaires dans le culot et le surnageant contenant la chlorophylle libérée est à nouveau traité par 200 décharges. Le graphique en Figure 68 présente les courbes obtenues par analyse au spectrophotomètre.

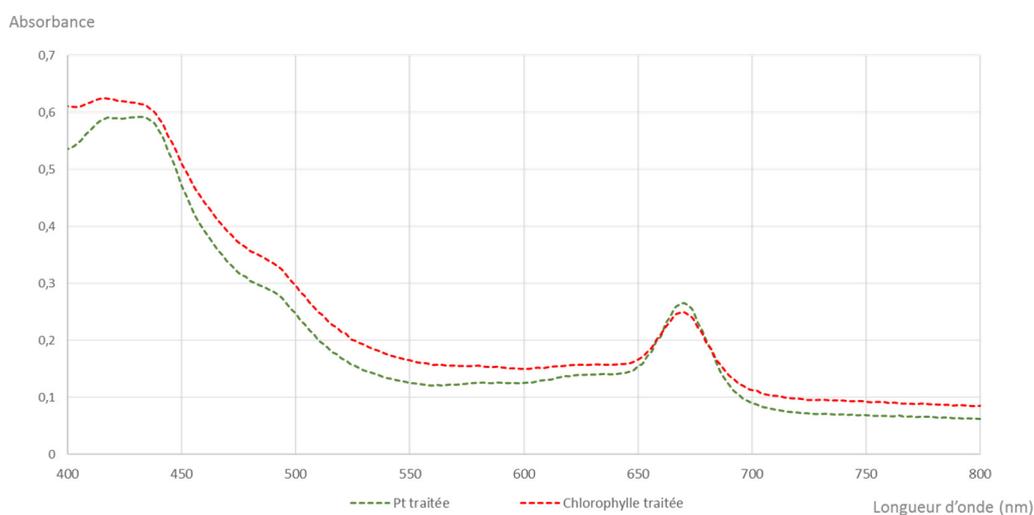


Figure 68 : Spectres d'absorbance d'un échantillon de *Phaeodactylum* traité par 200 impulsions haute tension et d'un échantillon contenant la chlorophylle extraite traitée par 200 impulsions.

L'amplitude du pic à 670 nm diminue de 6% lors du traitement de la chlorophylle par 200 impulsions. Dans cette étude, les effets des décharges sur la chlorophylle semblent donc pouvoir être négligés en première approximation.

2.4. Observation au microscope des échantillons

Différents échantillons contenant des microalgues *Phaeodactylum* non carencées ont pu être observés à l'aide d'un microscope Nikon eclipse Ti – DH. Ces solutions de microalgues sont de 3 types :

- Non traitées
- Traitées par 200 décharges haute tension
- Traitées au DMSO : la solution de microalgues non traitées a été mise en contact de DMSO dans les proportions **1 : 1**.

Initialement les concentrations en microalgues de ces échantillons sont identiques. Les images obtenues avec un grossissement x 40 sont présentées dans le tableau en Figure 69.

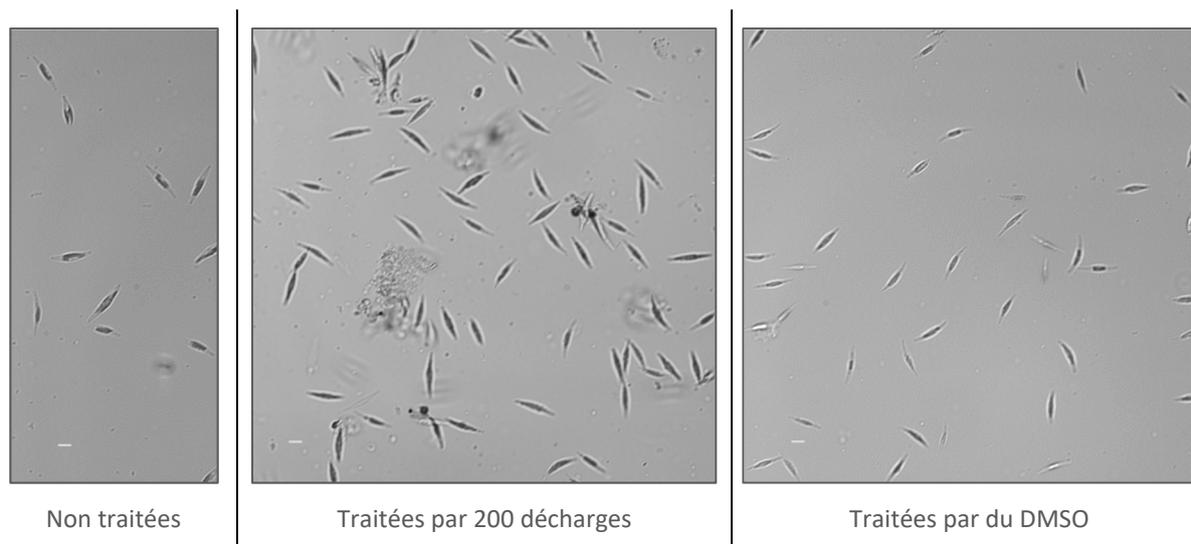


Figure 69 : Photographies prises au microscope optique de différentes solutions contenant des microalgues *Phaeodactylum*. La barre blanche représente 10 μ m.

Il est intéressant de noter la présence d'agglomérats de microalgues ou de débris dans l'échantillon traité par des décharges haute tension. Par ailleurs les membranes des microalgues traitées par le DMSO paraissent moins visibles. Enfin aucune différence n'est apparue flagrante en observant les structures de ces microalgues à ce niveau de grossissement.

3. Résultats

Face aux problèmes de caractérisation du taux d'ouverture à partir de la quantification de l'huile libérée lors du traitement, l'étude est dans un premier temps menée en quantifiant la chlorophylle libérée par absorbance. Des rendements d'extraction sont ensuite calculés en comparant la quantité de chlorophylle libérée par le traitement par des décharges haute tension avec celle libérée par traitement par du DMSO.

3.1. Impact du nombre de décharges sur le rendement de lyse

Dans ces expériences, une étude paramétrique en fonction du nombre de décharges appliquées dans la cuve est proposée. Cette étude est menée avec une solution contenant des microalgues issues de la souche *Phaeodactylum* à une concentration d'environ 10^8 cellules/mL. La cuve en U contient un volume de 180 μ L de solution à lyser. Les résultats obtenus sont présentés dans le graphique en Figure 70.

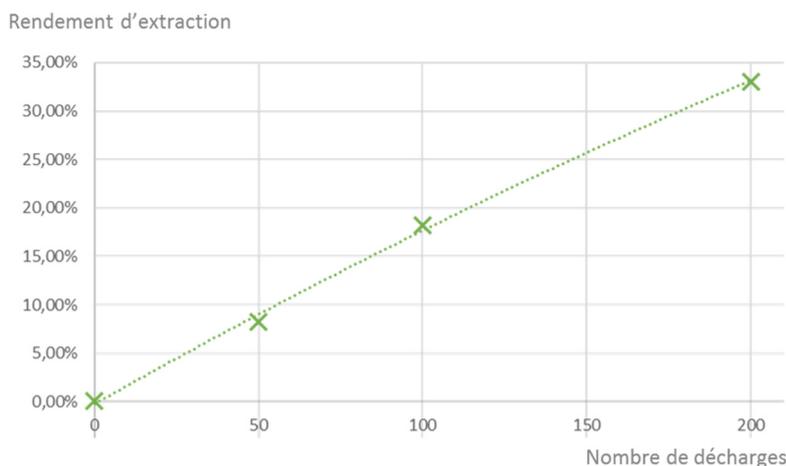


Figure 70 : Rendement d'extraction calculé à partir de la chlorophylle libérée d'une souche de *Phaeodactylum*.

Ces résultats indiquent clairement que pour un nombre modéré de décharges (jusqu'à 200), le rendement d'extraction varie de façon linéaire avec ce nombre. Ainsi un traitement par 200 décharges haute tension permet d'atteindre un rendement d'environ 33%.

Le but étant de développer un système peu énergivore, il est choisi dans cette étude de limiter le nombre de décharges à 200 car cela ne présente pas un grand intérêt de continuer à augmenter leur nombre avant de chercher à optimiser leur efficacité. De plus, lorsque l'on continue à augmenter le nombre de décharges à la fréquence de 10 Hz, des effets secondaires peuvent apparaître telles que la dégradation de la cuve, des pertes importantes de solution malgré la présence du bouchon, un échauffement trop important de la solution ou encore la présence de mousse. L'augmentation du nombre de décharges n'étant pas pour nous une voie d'amélioration du rendement d'extraction, d'autres pistes sont explorées.

3.2. Effet de la concentration des microalgues

Trois expériences relatives à trois cultures issues de la souche *Phaeodactylum tricornutum* ont été conduites dans des cuves en U remplies de 180 μ L de solution. On observe que les rendements calculés varient de façon significative d'une expérience à l'autre. Pour une meilleure lisibilité, il a été choisi de présenter en Figure 71 les résultats de cette étude sous forme d'un faisceau de courbes, chaque courbe correspondant aux résultats d'une expérience. La partie hachurée n'est pas interprétable car la concentration est trop faible et les mesures d'absorbance sont confondues avec le bruit de fond du spectrophotomètre.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues

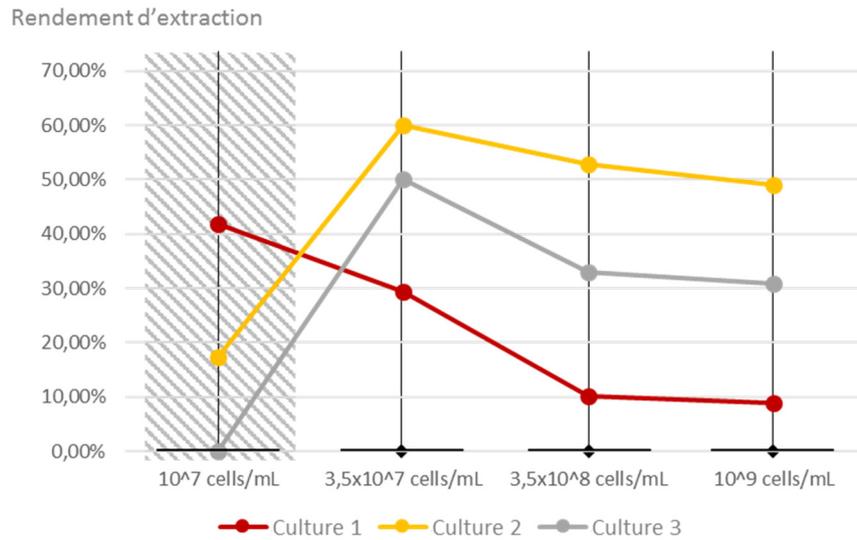


Figure 71 : Rendements d'extraction obtenus avec une souche de *Phaeodactylum* à différentes concentrations. L'expérience a été répétée pour trois cultures distinctes.

Les trois faisceaux de courbes ont, malgré des valeurs différentes, la même allure pour des concentrations supérieures à 10^7 cellules/mL : un rendement maximal d'extraction est trouvé pour une concentration de $3,5 \times 10^7$ cellules/mL, puis le rendement décroît lorsque la concentration augmente. Le rendement d'extraction maximal après traitement par des décharges haute tension est donc obtenu pour la plus faible concentration exploitable en microalgues.

3.3. Effets de la hauteur de solution

Suivant la stratégie présentée dans le chapitre 2 au paragraphe 5.2.3 l'impact de la hauteur de solution dans la cuve en U a été testé. La cuve a ainsi été remplie selon les volumes précédemment étudiés : 120 μ L ; 180 μ L ; 240 μ L et 360 μ L correspondant respectivement à des hauteurs de solution au-dessus des électrodes de 8 ; 14 ; 19 et 30 mm. Les résultats obtenus sont consignés dans le graphique en Figure 72.

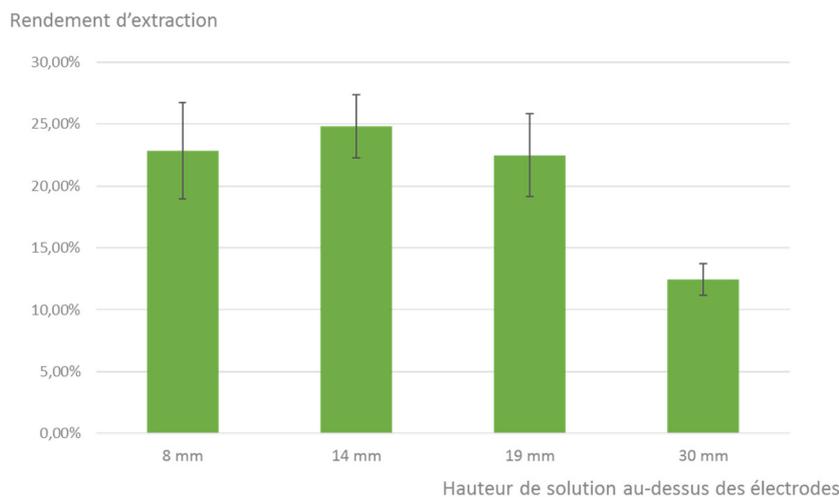


Figure 72 : Rendements d'extraction obtenus avec une souche de *Phaeodactylum* pour différents volumes de solution introduits dans la cuve en U.

Un rendement maximum est obtenu pour une hauteur de solution à 14 mm au-dessus des électrodes. De part et d'autre de cette hauteur les rendements décroissent. Ces résultats peuvent être corrélés avec ceux obtenus dans le chapitre 3 concernant le développement d'un nuage de cavitation potentiellement responsable de la lyse (cf. discussion ci-après dans le paragraphe 4.2).

3.4. Effets du chauffage et des oxydants produits au cours du traitement par les décharges

Comme observé dans le chapitre 3, au cours d'une série type de 200 décharges haute tension il y a apport de chaleur et création de radicaux libres. Les mesures effectuées montrent que l'apport de chaleur élève la température de la solution traitée jusqu'à une valeur proche de 90°C. De plus les radicaux libres créés entraînent la production d'oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène qui a été dosé à 1 mM.

Dans cette partie les effets de la température et de l'eau oxygénée seront étudiés indépendamment pour les deux souches de microalgues étudiées (*Phaedoactylum* et *Nannochloropsis*). La première de ces souches sera également étudiée sous les formes carencée et non carencée.

3.4.1. Effets de la température

Les expériences présentées dans cette partie ont été menées afin de tester l'impact du chauffage à 90°C des échantillons. Après 10 minutes, les solutions de microalgues ont été photographiées afin d'être comparées avec les solutions non traitées (cf. Figure 73). Sur ces photographies, un changement de coloration de la solution est nettement visible pour chaque échantillon : les solutions ont tendance à être plus translucides après chauffage.



Figure 73 : Photographies de différents échantillons de microalgues chauffés et non chauffés.

Les surnageants de ces différents échantillons sont analysés au spectrophotomètre et les courbes d'absorbance obtenues sont présentées en Figure 74. Pour chaque échantillon, la courbe en gris représente l'absorbance de l'échantillon traité par du DMSO et sert de référence.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues

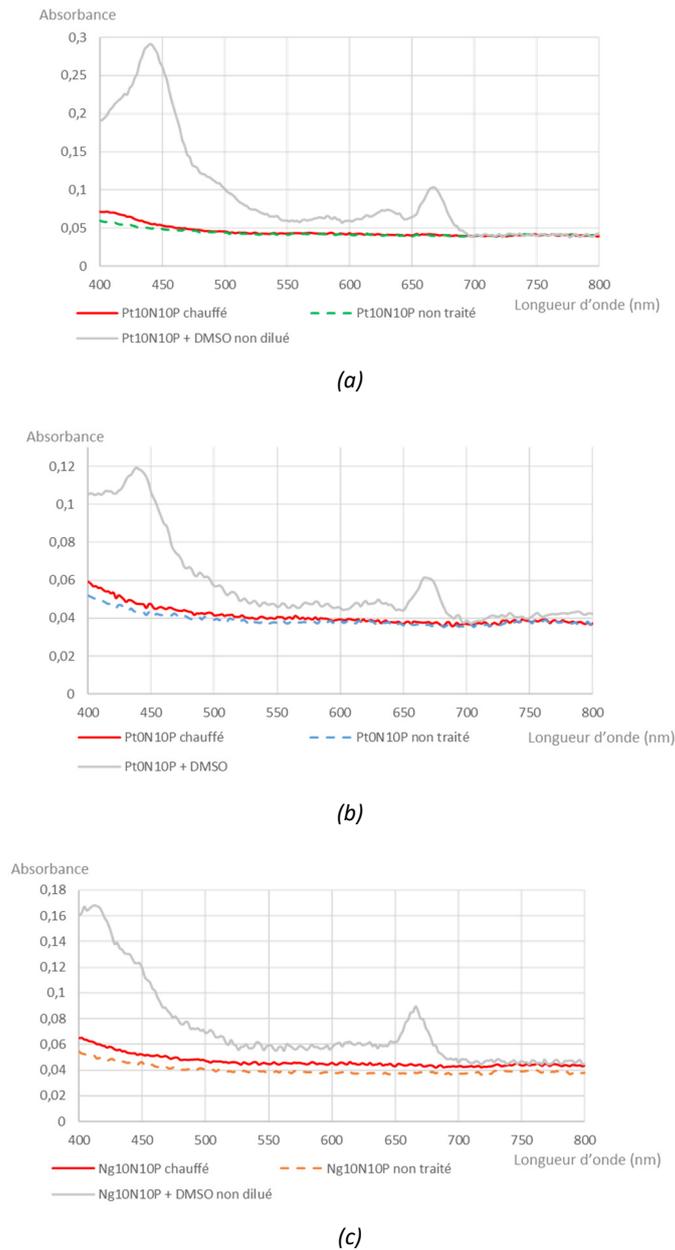


Figure 74 : Courbes d'absorbance des surnageants des échantillons chauffés et non traités : (a) avec une souche *Phaeodactylum* non carencée, (b) avec une souche *Phaeodactylum* carencée, (c) avec une souche *Nannochloropsis* non carencée.

Les courbes obtenues indiquent qu'aucune trace de chlorophylle n'est détectée dans les surnageants des échantillons chauffés. Le chauffage à 90°C des solutions de microalgues *Phaeodactylum* et *Nannochloropsis* n'entraîne donc pas la libération de la chlorophylle. Ces deux souches peuvent ainsi être qualifiées de thermoresistantes. En revanche, le changement de couleur des échantillons observé en Figure 73 indiquent tout de même une dégradation de la chlorophylle par l'augmentation de température.

3.4.2. Effets chimiques

Dans cette seconde partie les effets chimiques liés à la production d'oxydants sont évalués. Les courbes d'absorbance obtenues avant et après traitement d'une souche de *Phaeodactylum* par du peroxyde

d'hydrogène à une concentration de 1 mM sont présentées en Figure 75. La courbe de référence obtenue par traitement avec du DMSO est représentée en gris.

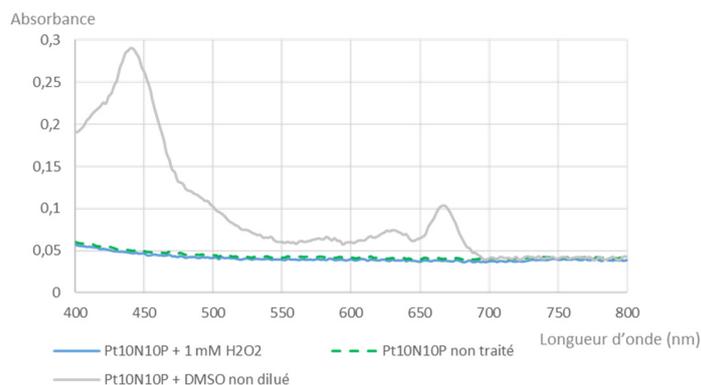


Figure 75 : Courbes d'absorbance de différents échantillons de *Phaeodactylum* traités et non traités par de l'eau oxygénée.

Au terme du traitement, les échantillons ne changent pas de couleur et la courbe d'absorbance du surnageant de l'échantillon traité ne révèle pas de trace de pigments. A cette concentration, le peroxyde d'hydrogène n'a pas d'effet visible sur les microalgues.

4. Discussions

4.1. Démarrage d'une activité de traitement des microalgues

L'introduction de cette activité au sein de mon laboratoire d'accueil s'est faite en plusieurs temps. Comme évoqué au début de ce chapitre, une phase de découverte et de compréhension des conditions de cultures des microalgues utilisées par le Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale a été indispensable. Différents points, par exemple la durée précise du temps d'incubation, la concentration en microalgues de l'échantillon final ou simplement l'état de la souche lors de la mise en culture, se sont révélés être des paramètres influençant de manière prépondérantes les résultats obtenus après traitement par décharges haute tension. Le développement progressif de la relation entre nos deux laboratoires partenaires a permis de cerner des conditions de culture nécessaires au bon déroulement des travaux effectués au LBAM. Enfin une phase de transfert des compétences de caractérisation des composés produits, du LPCV vers le LBAM, a été nécessaire.

A la suite de ce travail préliminaire, une première preuve de concept du fonctionnement de la technique de lyse par décharge haute tension a pu être obtenue dans la cuve en U avec des microalgues de l'espèce *Phaeodactylum tricornutum* carencée en azote. Après un traitement par 200 décharges, un calcul de rendement d'extraction donne 30% d'extraction en quantifiant la chlorophylle libérée, et moins de 8% d'extraction en quantifiant les lipides. Le rendement d'extraction calculé à partir de la chlorophylle a été retrouvé avec une grande reproductibilité, tandis que le calcul à partir des lipides donne des valeurs assez aléatoires mais toujours inférieure à 8%. Ces faibles valeurs associées à une grande variabilité sont très certainement dues à une mauvaise solubilité des lipides.

4.2. Des résultats en faveur d'une lyse par effets mécaniques

Les caractérisations ont donc été effectuées en quantifiant la chlorophylle. Suite à l'étude menée dans le chapitre 3, nous avons tenté d'isoler les acteurs potentiels de cette lyse. Les expériences ont montré qu'ici dans le cadre du traitement par décharges haute tension, la lyse n'a lieu ni par voie chimique, ni par voie thermique. Elle s'effectue donc principalement par voie mécanique à l'aide d'ondes de choc.

Chapitre 4 – Application de la technique de lyse sur des microalgues

Les résultats obtenus ont montré que la hauteur de la solution de microalgues et la concentration en microalgues de la solution ont toutes les deux des rôles significatifs dans l'efficacité du traitement. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 4.3.2 du chapitre 3, ces deux paramètres ont une influence sur le développement du nuage de cavitation.

Ainsi il convient de trouver un optimum, sachant que :

- plus le nuage de cavitation est étendu, plus les ondes de choc principales (issues de la formation du plasma et rebond de la bulle inter-électrodes) sont atténuées,
- plus le nuage de cavitation est développé, plus le nombre d'ondes de choc libérées par le collapse des bulles du nuage de cavitation est important.

Dans notre étude, un optimum semble avoir été trouvé en fixant la concentration en microalgues à $3,5 \cdot 10^7$ cellules par millilitre et la hauteur de solution égale à 14 mm au-dessus des électrodes.

4.3. Récupération des composés d'intérêt

La quantification de la chlorophylle en suspension dans les échantillons après traitement par des décharges haute tension a permis de tirer certaines conclusions de cette étude. Des pistes ont été explorées pour quantifier les lipides normalement relargués dans le même temps, notamment en ajoutant un tensioactif ou un solvant dans lequel les triacylglycérides sont particulièrement solubles.

L'ajout de tensioactif est censé permettre la solubilisation des molécules lipidiques, dont la densité est proche de celle de l'eau. Une solution de triton à 0,05% a été utilisée. Deux options ont été testées :

- Ajouter le tensioactif **avant** le traitement par décharges haute tension. Dans ce cas le brassage engendré par la répétition des décharges produit une mousse qui perturbe les mesures optiques ultérieures.
- Ajouter le tensioactif **après** le traitement, et avant l'analyse par fluorescence à l'aide du Rouge de Nil. Dans ce cas, aucune élévation significative de la quantité d'huile n'a été détectée dans le surnageant.

Ces essais n'ayant pas été concluants, l'utilisation d'un solvant organique a été testée.

L'ajout d'un solvant organique permet de capter les molécules lipidiques dans une seconde phase non aqueuse. Un solvant adapté aux triacylglycérides peut être le cyclohexane. De la même façon que pour le tensioactif, la question du moment de l'ajout s'est posée. Les deux options précédentes ont également été mises en œuvre : avant et après traitement par les décharges haute tension. Lorsque le cyclohexane est ajouté avant le traitement, le brassage engendré entraîne la formation d'un mélange impossible à analyser par nos techniques optiques. Lorsque le cyclohexane est ajouté après l'analyse par fluorescence à l'aide du Rouge de Nil, aucune élévation significative de la quantité d'huile n'a été détectée dans le surnageant. Une partie importante du travail reste donc la mise au point d'un protocole permettant de localiser correctement les lipides relargués après traitement par les décharges. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- dans une phase non aqueuse à la surface de la solution,
- avec les débris cellulaires concentrés dans le culot,
- sur les parois de la cuve ou des électrodes.

Enfin des traitements supplémentaires doivent être effectués avant de récupérer également d'autres composés d'intérêt tels que certaines protéines, certains pigments... (cf. chapitre 1).

Chapitre 5

Application de la technique de lyse à des bactéries

Dans ce chapitre, les deux aspects du terme « lyse », à savoir la désagrégation de la cellule entraînant sa mort et la destruction de sa membrane permettant la libération du contenu intracellulaire, vont être étudiés sur des bactéries. Les microorganismes utilisés pour cette étude seront des bactéries issues de deux souches bien connues, de structures membranaires différentes : *Escherichia coli* (Gram négatif) et *Bacillus subtilis* (Gram positif). Contrairement au chapitre précédent, les protocoles d'analyses n'auront pas à être préalablement mis au point et validés.

Après un traitement par des décharges haute tension, deux types d'analyses sont effectuées afin de vérifier d'une part si les bactéries sont encore cultivables, d'autre part si la quantité d'ADN en solution a changé. Les premiers résultats assez exploratoires soulèvent des questions auxquelles nous tâchons de répondre au fil de ce chapitre.

1. Matériels et méthodes

1.1. Fabrication des cuves

Deux types de cuves en U ont été conçues au cours de ces expériences : des cuves fabriquées par assemblage de cartes en COC et des cuves produites par stéréolithographie, une des techniques d'impression 3D. Les cuves en COC sont identiques à celles utilisées dans les chapitres précédents (cf. section 2.2 du chapitre 2). Seul l'écart entre les pointes des électrodes change dans la dernière partie du présent chapitre dans lequel quatre variations seront présentées : 1,5 mm ; 2 mm ; 3 mm et 4 mm. Les cuves produites par stéréolithographie sont au préalable conçues à l'aide du logiciel Solidworks. Les fichiers de conception sont envoyés à un laboratoire de l'école Génie Industriel, membre de l'Institut Polytechnique de Grenoble, où la pièce est fabriquée sans les électrodes. La cuve est fabriquée à partir d'un photopolymère (LS600 commercialisé par envisionTEC). Les électrodes en acier inoxydable, identiques à celles utilisées pour fabriquer la cuve en COC, sont fixées à l'aide de colle UV. Des pas de vis sont également taraudés de façon à pouvoir maintenir le bouchon en COC.

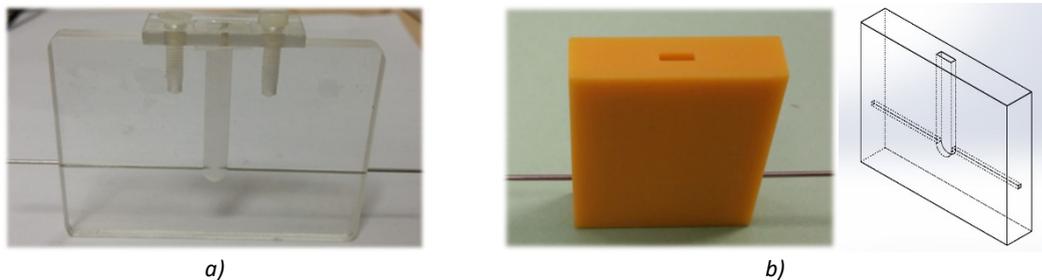


Figure 76 : Photographies des cuves utilisées dans ce chapitre : a) Cuve en COC bouchée, b) Cuve produite par impression 3D.

1.2. Préparation des cultures de bactéries

Les cultures de bactéries sont préparées à partir des souches suivantes : *Escherichia coli* (ATCC 9637) et *Bacillus subtilis* (ATCC 23587). Notons que ces deux bactéries répondent différemment au test de Gram : la membrane de *E. coli* permet la fixation du colorant utilisé lors du test (bactérie gram positive), tandis que celle de *B. subtilis* ne fixe pas le colorant (bactérie gram négative). Ce résultat est lié à la présence d'une couche de peptoglycane constituant la membrane des bactéries, épaisse (entre 50 et 100 nm) chez *B. subtilis* et bien plus fine (entre 10 et 15 nm) chez la bactérie *E. coli*.

Pour la culture d'*E. coli* un volume de 20 μ L de la souche ATCC est mis en suspension dans 25 mL de milieu LB (Lysogeny Broth). Pour la souche *B. subtilis* la culture est effectuée avec les mêmes volumes dans un milieu TSB (Tryptic Soy Broth). Les cultures sont laissées en incubation sous agitation à 450 tr/min pendant 16 heures à 37°C pour *E. coli* et à 30°C pour *B. subtilis* (résumé dans le Tableau 1).

Nom de la souche	N° ATCC	Milieu de culture	Incubation
<i>E. coli</i>	9637	Lysogeny Broth (LB)	16 heures à 37°C
<i>B. subtilis</i>	23587	Tryptic Soy Broth (TSB)	16 heures à 30°C

Tableau 1 : Conditions de culture des bactéries.

Après incubation, 2 mL de chaque culture sont récupérés puis dilués 2000 fois pour comptage sur lame au microscope. A partir de ce comptage, des échantillons « stock » sont préparés en diluant le reste

de la culture dans le volume adapté d'eau ultra-pure. La concentration des échantillons « stock » est comprise entre 10^4 et 10^6 bactéries/mL.

1.3. Traitement des échantillons

Toute la manipulation suivante est, comme dans les chapitres précédents, effectuée dans une salle grise (ISO 5) dont la température, la pression et le taux d'humidité sont maintenus constants respectivement à 21°C, 1013 hPa, 50%. Les mêmes dispositifs sont utilisés pour produire, contrôler et mesurer la décharge haute tension.

De manière similaire au chapitre 4, la conductivité de l'échantillon « stock » est d'abord ajustée pour faciliter le claquage diélectrique lors des décharges électriques haute tension. Dans le chapitre 2 il a été choisi de travailler avec une conductivité d'environ 50 mS/m. Un petit volume d'une solution d'eau contenant des ions NaCl est donc ajouté à la solution de bactéries. Typiquement cet ajout est de 100 μ L d'une solution de NaCl de conductivité 500 mS/m dans 900 μ L d'eau ultra-pure contenant les bactéries.

Avant toute utilisation la cuve est désinfectée avec de l'alcool à 70°, rincée abondamment avec de l'eau ultra-pure puis séchée avec une soufflette d'air comprimé filtré et sec. L'échantillon à traiter est alors introduit dans la cuve à l'aide d'une propipette adaptée au volume souhaité. Si la cuve sert plusieurs fois, elle est entre chaque utilisation rincée abondamment à l'eau ultra-pure et séchée avec la soufflette.

La cuve est ensuite fermée avec un film plastique Parafilm M® plaqué par un morceau d'Ecoflex® et une plaque en COC maintenue par deux vis sur la carte (cf. section 1.1 du chapitre 4). Les décharges électriques haute tension sont alors produites au sein de la cuve. Les impulsions à l'origine des décharges ont une durée de 30 μ s, une amplitude de 10 kV et sont répétées à une fréquence de 2 Hz.

1.4. Analyse des bactéries traitées

1.4.1. Lyse des bactéries par broyage

Une technique de lyse bien connue fondée sur le broyage est utilisée depuis plusieurs années dans le laboratoire à l'aide d'un appareil commercialisé par Bertin Instruments, appelé Précellys® 24. Cet appareil agite des tubes contenant l'échantillon à lyser et des billes de verre. L'action de ces billes sur les cellules en solution détruit mécaniquement et efficacement les membranes (Verollet, 2008).

Lors d'une « lyse par Précellys », 50 μ L d'échantillon sont introduits dans un tube Eppendorf de 250 μ L accompagnés de billes solides. Les tubes sont agités deux fois pendant 20 secondes sous l'action du Précellys®. Ils sont ensuite centrifugés afin de concentrer dans le culot les billes et pouvoir récupérer l'échantillon dans le surnageant.

1.4.2. Mesure du taux de survie par culture sur boîtes de Pétri

Les cultures de bactéries se font dans des boîtes de Pétri en plastique. 100 μ L de l'échantillon à analyser sont déposés sur une gélose à base d'agar adaptée à la bactérie : *B. subtilis* est déposée sur une gélose TSB (Tryptone Soya Broth) et *E. coli* sur une gélose TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide).

La gélose TSB est préparée en mélangeant de l'agar en poudre à 20 g/L et du milieu TSB à 30 g/L dans de l'eau ultra-pure. La gélose TBX est formée en ajoutant de la poudre TBX à 36,6 g/L dans l'eau ultra-pure. Les deux géloses sont stérilisées à l'autoclave. Lorsque l'échantillon à analyser a été déposé, les

boîtes de Petri sont alors mises en culture pendant 24 heures : à 30°C pour *B. subtilis* et à 44°C pour *E. coli*. Les photographies présentées dans ce rapport ont été enregistrées à la sortie de l'étuve.

1.4.3. Quantification de l'ADN par l'intermédiaire d'une réaction en chaîne polymérase (PCR)

1.4.3.1. Principe de la PCR quantitative

La mesure de la quantité d'ADN présent en solution par PCR quantitative, appelée aussi PCR en temps réel, repose sur l'observation à l'aide d'un marqueur fluorescent de l'état d'avancement d'une réaction en chaîne par polymérase (Heid et col., 1996).

Pour rappel, une réaction en chaîne par polymérase, appelée PCR (pour *Polymerase Chain Reaction*) est une technique d'amplification d'une séquence d'ADN ou d'ARN connue, permettant de produire in vitro une quantité importante, de l'ordre du milliard, de copies en une heure. Cette technique repose sur l'utilisation d'une enzyme polymérase activée à une certaine température et de matériel génétique (amorce et dNTP par exemple) permettant la reconnaissance et la duplication de la séquence d'ADN connue. Des variations de températures contrôlent les différentes étapes de la réaction (cf. Figure 77). Ces variations de températures sont répétées plusieurs fois sous forme de cycle de réplication : en théorie à chaque cycle la quantité d'ADN est multipliée par 2.

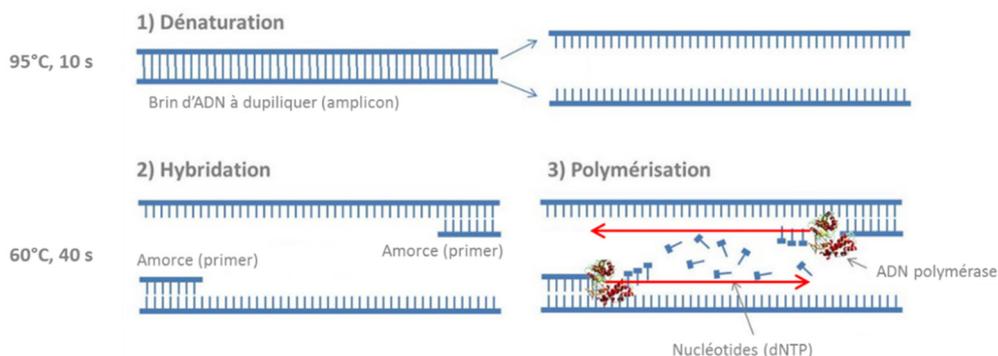


Figure 77 : Principales étapes de PCR. Les températures et durées indiquées sont celles utilisées dans les expériences suivantes.

Dans le cas de la PCR quantitative, des marqueurs fluorescents sont introduits dans le mélange réactionnel. Lors de l'hybridation les marqueurs sont activés (cf. Figure 78). L'intensité de fluorescence de l'échantillon est donc proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présent. De plus, sachant que la quantité d'ADN double brin est doublée à chaque cycle de PCR, il est possible d'écrire :

$$\lambda_i \propto n_i \times 2^{\text{nombre de cycles}} \quad (5.1)$$

où λ_i représente la fluorescence de l'échantillon i à la fin d'un cycle de PCR et n_i le nombre de copies d'ADN de l'espèce initialement présente dans l'échantillon.

En pratique on définit un seuil de fluorescence identique pour tous les échantillons d'une acquisition. Lorsque ce seuil de fluorescence est atteint par exemple par deux échantillons notés 1 et 2 contenant la même séquence à des concentrations initiales différentes, on obtient la relation :

$$n_1 \times 2^{\text{cycles de détection de l'échantillon 1}} = n_2 \times 2^{\text{cycles de détection de l'échantillon 2}} \quad (5.2)$$

A partir de cette relation, la quantité d'ADN dans un échantillon peut être évaluée par référence à un autre échantillon.

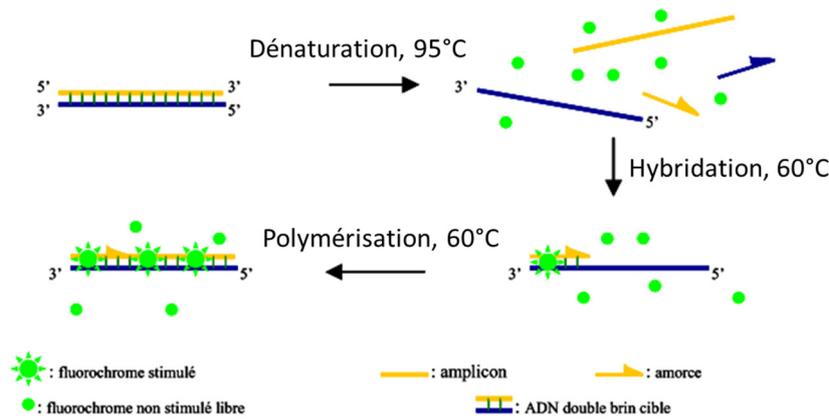


Figure 78 : Déroulement de la PCR quantitative : le fluorochrome est activé en présence d'ADN double brin (Poitras & Houde, 2002).

1.4.3.2. Conditions de réalisation

L'analyse en PCR quantitative est effectuée à l'aide du système qPCR Stratagene® Mx3005 et du logiciel MxPro. Ce système analyse la fluorescence de puits sur une plaque, permettant d'observer jusqu'à 96 échantillons. Chaque puits analysé contient 10 µL d'un mélange de 5 µL d'échantillon et 5 µL de mix PCR contenant notamment l'enzyme de réplication et le marqueur fluorescent. L'enzyme utilisée est une "fast polymerase HawkZ05" développée par Custombiotech.

Pour chaque échantillon deux puits sont préparés :

- Dans l'un d'eux 5 µL de solution contenant les bactéries traitées par les décharges électriques sont déposés directement. Ce puits est appelé « PCR Direct » dans les résultats.
- Dans le second puits, le même échantillon est déposé après avoir subi une lyse à l'aide du Prêcellys® 24 de Bertin. 5 µL de surnageant lysé sont récupérés et analysés dans un puits en qPCR après avoir ajouté les 5 µL de mix. Le puits rempli est appelé « PCR Prêcellys » dans les résultats.

1.5. Analyse de l'ADN en solution

1.5.1. Préparation de l'échantillon d'ADN

L'impact des décharges haute tension sur les brins d'ADN est évalué avec des échantillons d'ADN libre en solution. Deux techniques pour caractériser l'ADN en solution sont utilisées : une migration des brins d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et une mesure à l'aide d'une biopuce sur un appareil autonome. Afin d'obtenir des résultats interprétables, ces deux techniques exigent de travailler avec des concentrations en ADN assez élevées (> 0,1 ng/µL). Une telle concentration d'ADN en solution est atteinte rapidement et facilement en répliquant un amplicon caractéristique de *Serratia marcescens* (Sm) de 140 paires de bases. La séquence est répliquée pendant 40 cycles de PCR. La concentration finale des échantillons d'ADN en solution est proche de 1,4 ng/µL.

1.5.2. Mesure sur gel d'agarose

1.5.2.1. Principe de la mesure

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique permettant de séparer les brins d'ADN selon leur poids moléculaire sous l'action d'un champ électrique et d'un gel poreux.

Pour cela le gel d'agarose est placé entre deux électrodes soumises à une différence de potentiel de plusieurs dizaines de volts en continu. Les échantillons à analyser sont introduits dans des puits creusés dans ce gel d'agarose. Un colorant adapté est ajouté dans chaque puits afin de suivre la position des fragments d'ADN sur le gel. L'un des puits contient un mélange étalonné appelé « Ladder » composé d'une série de fragments dont la taille et la quantité sont connus. Par l'effet d'un tampon légèrement basique de pH 8,6, les groupements phosphate des brins d'ADN sont ionisés et portent alors une charge négative. Ils sont alors attirés vers l'anode sous l'effet de la force de Coulomb. En réaction, le gel d'agarose poreux, exerce sur l'ADN une force de traînée proportionnelle à la taille du fragment. Les fragments sont ainsi séparés selon leurs tailles : plus leur taille est faible, plus leur vitesse de migration vers l'anode est importante. Au terme du temps de migration choisi, le gel est observé sous ultra-violet afin de faire fluorescer le marqueur utilisé.

1.5.2.2. Conditions de réalisation

Un gel E-Gel® (commercialisé par ThermoFisher) 2% agarose a été utilisé, permettant de séparer par électrophorèse des fragments d'ADN entre environ 30 et 2000 paires de bases. Le ladder TrackIt™ 50 bp est introduit dans le premier puits de dépôt du gel et contient 16 fragments de 50 à 800 paires de bases. Les colorants fluorescents utilisés sont le xylène cyanol FF et la tartrazine. Dans chacun des autres puits de dépôt, 18,5 µL d'échantillon à analyser sont introduits accompagnés de 1,5 µL de tampon contenant du colorant. La migration des molécules selon leurs tailles s'effectue pendant 30 minutes à l'aide du système E-Gel® Adaptator Base. Le gel est ensuite observé à l'aide du système E-Gel® Imager constitué notamment d'une caméra fixée au-dessus de la base.

1.5.3. Mesure sur une biopuce

Le système Agilent 2100 Bioanalyzer utilisé dans le cadre de cette étude, est fondé sur la technique d'électrophorèse décrite précédemment, appliquée à une échelle micrométrique. Ce système permet ainsi de réduire significativement le temps d'analyse et la quantité d'échantillon nécessaire. Accompagné de son logiciel d'exploitation, il permet de détecter des fragments d'ADN en solution et de mesurer leurs concentrations.

Les échantillons à analyser sont déposés dans les micro-puits d'une puce adaptée (cf. Figure 79-a) ; chaque micro-puits est rempli de seulement 1 µL d'échantillon. La puce est composée de 16 micro-puits et permet l'analyse de 12 échantillons différents. Les 4 micro-puits restants contiennent le ladder, le colorant, des intercalants et le polymère dans lequel l'électrophorèse est effectuée. Le mélange de ces différents constituants est effectué par l'intermédiaire de canaux microfluidiques (cf. Figure 79-b). La migration des fragments d'ADN est suivie à l'aide de la fluorescence du colorant induite par laser.

La puce préparée est placée dans le bioanalyseur puis l'instrument effectue l'analyse de façon autonome en 5 minutes (cf. Figure 79-c).

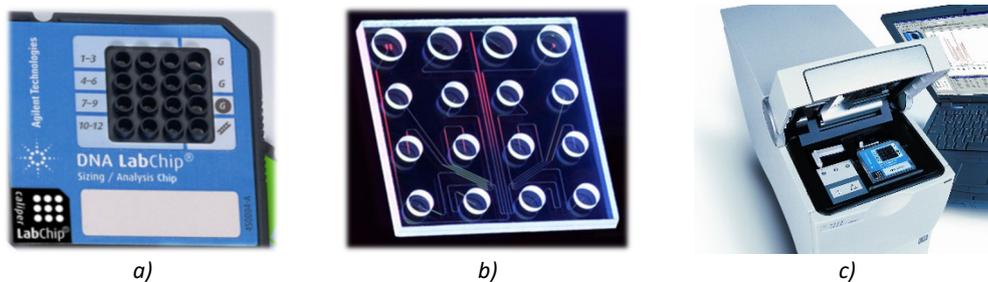


Figure 79 : Bioanalyseur Agilent : a) photographie de la puce utilisée, b) mise en évidence des canaux microfluidiques de la puce, c) dispositif complet (photographies extraites du manuel d'utilisateur).

2. Résultats

2.1. Preuve de concept

Dans cette partie, deux effets d'un traitement par décharges haute tension seront présentés de façon distincte : la désinfection d'un échantillon contenant initialement des bactéries et la libération de contenu intracellulaire. Pour cela, on estimera que la désinfection d'un échantillon est efficace lorsque sa mise en culture sur boîte de Pétri n'entraîne pas la formation de colonies de bactéries. La libération du contenu intracellulaire sera quant à elle étudiée en mesurant l'évolution de la quantité d'ADN présent en solution.

2.1.1. Comme technique de désinfection

Les échantillons contenant *B. subtilis* ont subi différents traitements dans une cuve en COC. Cette cuve est remplie à deux niveaux : 8 mm et 30 mm de solution au-dessus des électrodes. Le nombre de décharges haute tension est fixé à 10, 100 ou 200. Les résultats des mises en culture de ces échantillons sont présentés avec les photographies des boîtes de culture présentées en Figure 80.

Sur ces images, le développement des colonies est observable car celles-ci forment un tapis ou des tâches grisâtres dans les boîtes de Pétri. Visuellement il est donc possible d'obtenir une estimation du nombre de bactéries encore vivantes et donc capables de former des colonies. La quantité initiale de bactéries est d'environ 50 000 bactéries par boîte. Dans la boîte de référence mise en culture à partir de l'échantillon non traité, les colonies se sont fortement développées. Dans la colonne « 8 mm », peu de colonies sont visibles : après 10 décharges, seules 5 colonies sont dénombrables soit un taux de survie d'environ 1/10 000 ; sur les échantillons traités par 100 et 200 décharges, aucune tâche n'est visible dans les boîtes de Pétri, ce qui permet de conclure qu'aucune bactérie n'a été capable de former de colonie ; le taux de survie est alors inférieur à 1/50 000. Dans la colonne « 30 mm », les échantillons ont été traités dans la cuve remplie complètement : après 10 décharges, le tapis de colonies est encore bien visible dans la boîte de Pétri, après 100 décharges quelques colonies sont encore visibles. Après 200 décharges, seules 2 colonies sont apparues dans la boîte, on peut alors estimer un taux de survie d'environ 1/25 000. Ces résultats indiquent que la désinfection est plus efficace lorsque la cuve est remplie avec une hauteur de solution de 8 mm au-dessus des électrodes.

Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche *E. coli*, bactérie gram négative. Les photographies des boîtes de Pétri sont présentées en Figure 81 obtenues également à partir d'une quantité initiale de 50 000 bactéries.

Cette culture de bactéries, visiblement plus résistantes que celle de *B. subtilis*, subit la même tendance : lorsque la cuve est remplie de solution jusqu'à une hauteur de 30 mm au-dessus des électrodes, de nombreuses colonies sont encore visibles, même après un traitement par 200 décharges. En revanche pour une hauteur de solution plus faible (8 mm) à partir de 100 décharges, la mise en culture des échantillons traités n'a pas donné naissance à de nouvelle colonie. La désinfection est donc également efficace avec des bactéries de la souche *E. coli*, en particulier pour une hauteur de solution de 8 mm avec au moins 100 décharges haute tension.

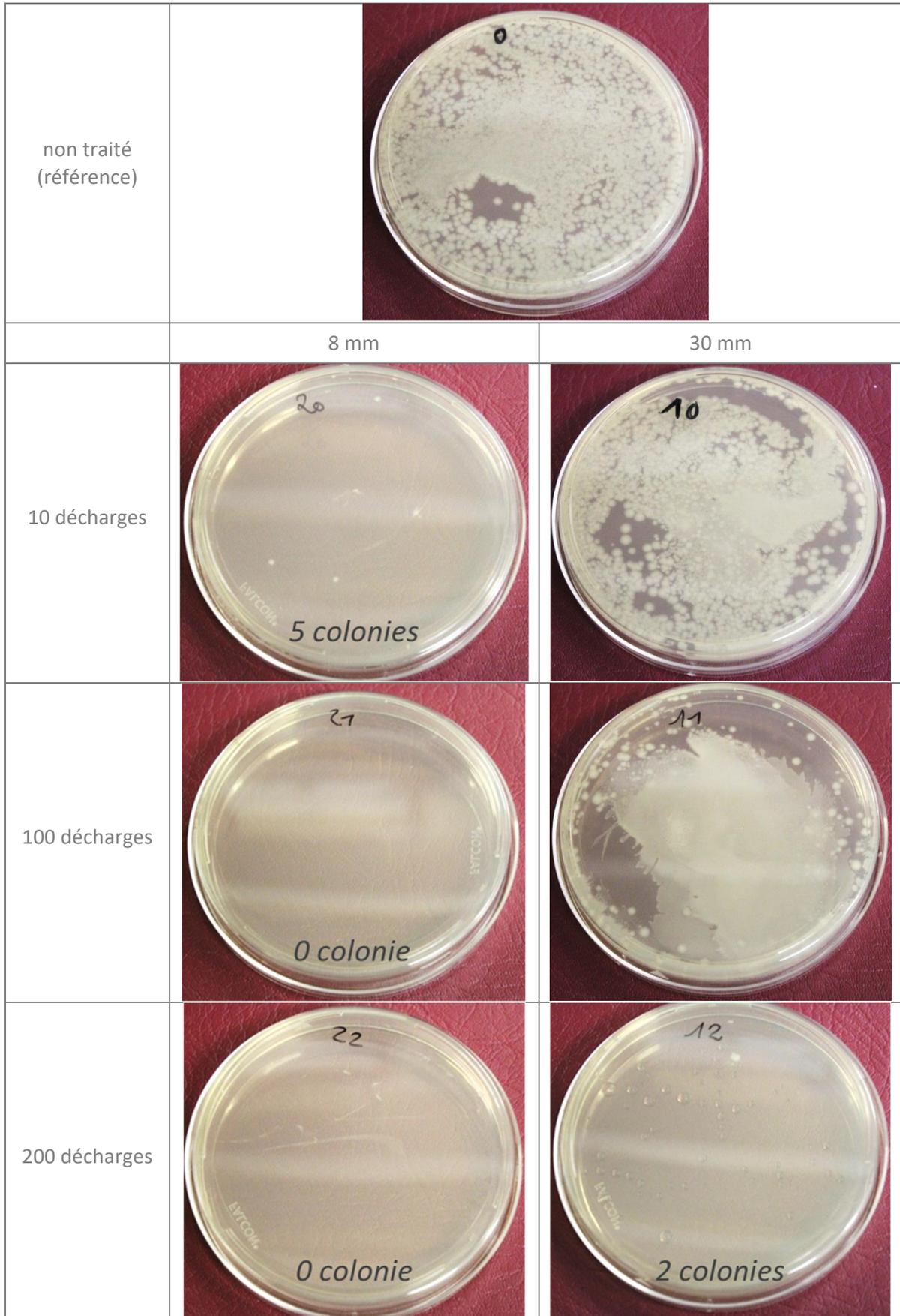


Figure 80 : Photographies des boîtes de Pétri après incubation pendant 24 heures des échantillons *B. subtilis* traités par des décharges haute tension.

Chapitre 5 – Application de la technique de lyse à des bactéries

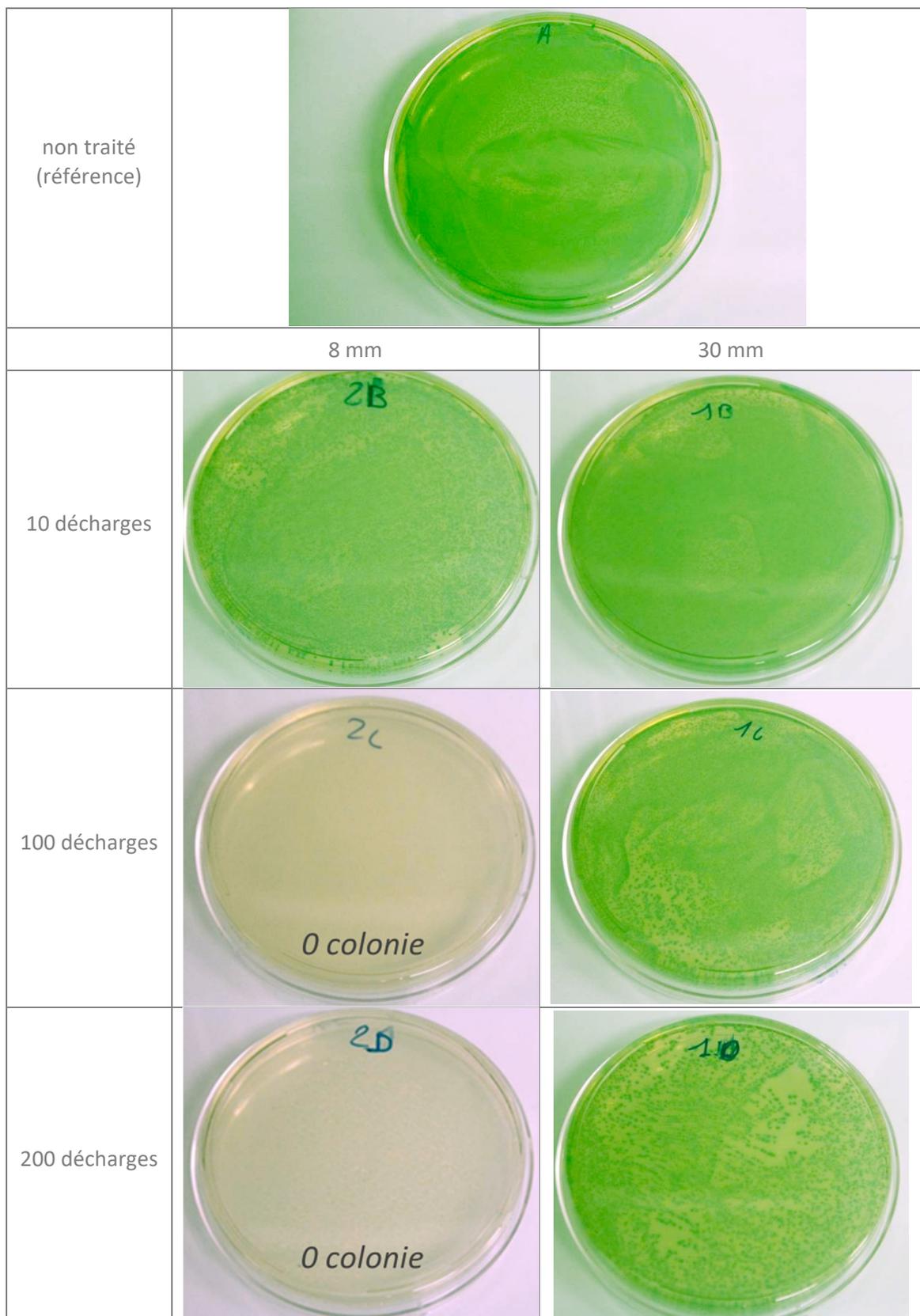


Figure 81 : Photographies des boîtes de Pétri après incubation pendant 24 heures des échantillons *E. coli* traités par des décharges haute tension. Les colonies ont été marquées par un colorant vert.

2.1.2. Comme technique d'extraction de contenu intracellulaire

L'effet inhibiteur du traitement par les décharges haute tension ayant été prouvé à l'aide des cultures de bactéries, nous nous intéressons dans la suite de ce paragraphe à rechercher l'ADN en solution ; sa quantification permet de calculer un rendement d'extraction du contenu intracellulaire.

Les mesures sont effectuées à partir d'une culture de bactéries *B. subtilis* traitée dans une cuve de 2 mm d'épaisseur en COC. La cuve est remplie de solution jusqu'à 19 mm au-dessus des électrodes et les impulsions sont répétées à 10 Hz. Le Tableau 2 présente les nombres de cycles de réplication nécessaires pour atteindre un même seuil de fluorescence en solution après différents traitements. Pour chaque échantillon traité, le nombre de cycles d'avance sur l'échantillon non traité permet d'estimer l'augmentation de la quantité d'ADN en solution.

Traitement	Cycles de détection PCR	Cycles d'avance sur l'échantillon non traité
Control nég.	Aucune détection	-
Non traité	26,9	-
1 décharges	26,5	0,4
11 décharges	26,3	0,6
61 décharges	25,6	1,3
161 décharges	24,7	2,2
661 décharges	23,9	3,0

Tableau 2 : Résultats de PCR sur des échantillons traités par des décharges haute tension.

En tenant compte du fait qu'à chaque cycle la quantité d'ADN présent en solution est environ multipliée par 2, la quantité relative d'ADN détecté par rapport à l'échantillon non traité est égale à $2^{\Delta Ct}$ (cf. Figure 82).

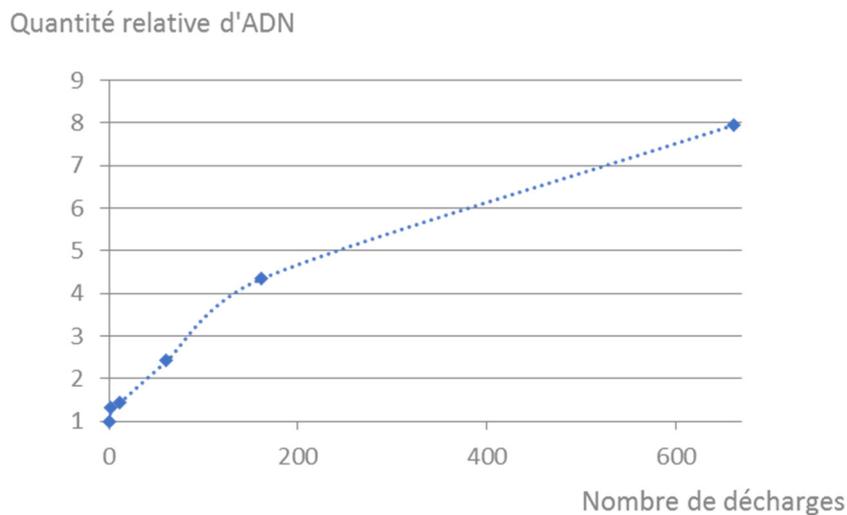


Figure 82 : Quantité relative d'ADN de *B. subtilis* trouvé dans le surnageant de l'échantillon en fonction du nombre de décharges effectuées.

A la vue de ces résultats, l'effet des décharges électriques haute tension sur une culture de bactéries en solution est donc double : les décharges permettent à la fois l'inhibition de la culture de bactéries, et l'ouverture de ces bactéries dans le but d'en extraire leur contenu. En outre, un lien entre l'efficacité du traitement et le nombre d'impulsions est mis en évidence.

Dans la suite de ce chapitre, l'efficacité de cette technique va être comparée avec d'autres méthodes de lyse.

2.2. Comparaison entre plusieurs techniques d'extraction de l'ADN

Dans un premier temps, l'efficacité de différents traitements est comparée sur une même souche de bactéries *B. subtilis* :

- Par un appareil commercial fondé sur une lyse mécanique par broyage : *Précellys*
- Par apport de chaleur en portant la solution à lyser à 95°C pendant 10 minutes
- Par quelques décharges électriques haute tension (15 décharges dans 250 µL de solution)
- Par quelques centaines de décharges électriques haute tension (200 décharges dans 250 µL de solution)

Le Tableau 3 présente les nombres de cycles de réplication nécessaires pour atteindre un même seuil de fluorescence obtenus avec une souche de bactéries *B. subtilis* en PCR quantitative. L'écart avec un échantillon non traité (noté Direct) est également calculé pour chaque traitement.

Traitement	Cycles de détection PCR	Ecart Direct
Direct (non traité)	32,2	-
<i>Précellys</i>	21,8	10,4
<i>Chauffage (10 min à 95°C)</i>	32,8	-0,6
<i>15 décharges</i>	29,3	2,9
<i>200 décharges</i>	26,9	5,3

Tableau 3 : Résultats de PCR sur des bactéries *B. subtilis* traitées de différentes façons.

Ces résultats sont présentés graphiquement sur la Figure 83 sous forme d'histogramme avec une échelle logarithmique en base 2, dans la mesure où chaque cycle de réplication se traduit par un doublement de la quantité d'ADN :

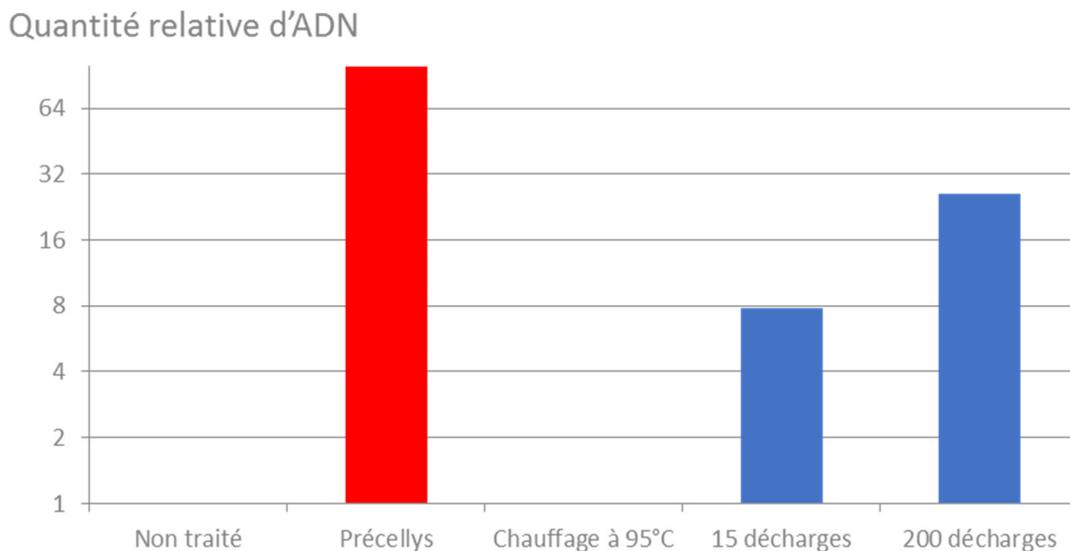


Figure 83 : Représentation graphique de la quantité relative d'ADN en solution détecté dans les différents échantillons.

Dans cette série d'expériences, les résultats obtenus en PCR quantitative indiquent que :

- Chauffer la souche n'augmente pas la quantité d'ADN libéré en solution. Une augmentation significative de la température (10 minutes à 95°C) n'entraîne pas la lyse des bactéries. La souche *B. subtilis* employée peut donc être qualifiée de **thermorésistante**.
- L'écart entre les seuils de détection de l'échantillon non traité et de l'échantillon traité par l'action du Précellys est de 10,4. Il s'agit ici d'une souche plutôt résistante.
- La quantité d'ADN libéré est significative après un traitement par 15 décharges.
- La quantité d'ADN libéré augmente en appliquant 200 décharges.

La quantité d'ADN libéré par des décharges dans ces expériences reste bien inférieure à la quantité d'ADN libéré lors du traitement par le Précellys. Par conséquent dans la suite de cette étude les résultats obtenus après traitement par des décharges haute tension seront comparés à ceux obtenus après traitement par le Précellys.

2.3. Caractérisation du traitement par décharges haute tension pour libérer l'ADN par comparaison avec l'instrument Précellys 24

Le volume de solution introduit dans la cuve et le nombre de décharges vont être modifiés indépendamment de façon à étudier leur impact sur l'efficacité du traitement.

Deux types d'échantillons ont été préparés : une première série au cours de laquelle le traitement par les impulsions haute tension a été effectué dans une cuve remplie (30 mm de solution au-dessus des électrodes), et une seconde série dans une cuve faiblement remplie (8 mm). Pour chaque série des échantillons traités par 10, 100 et 200 décharges ont été préparés. Un échantillon introduit dans la cuve et n'ayant subi aucun traitement est également observé. Lors de l'analyse en PCR, les deux types de mesures ont été effectuées : une « PCR **Direct** » et une « PCR après **Précellys** ».

2.3.1. Mise en évidence de la libération et de pertes lors du traitement par décharges haute tension

En « PCR Direct », la PCR quantitative est effectuée pour un échantillon donné. Plus l'échantillon atteint rapidement le seuil de fluorescence, c'est-à-dire plus le nombre de cycles de réplication est faible, plus la quantité initiale d'ADN dans l'échantillon est importante.

En « PCR après Précellys », la PCR quantitative est démarrée après un traitement par le système Précellys® 24. Les échantillons non traités par les décharges haute tension subissent donc un seul traitement de lyse par broyage. Les échantillons traités par les décharges subissent en somme deux traitements : le traitement électrohydraulique et le traitement par broyage. Ces acquisitions permettent de mesurer la quantité d'ADN total présent dans l'échantillon, en tenant compte de l'ADN qui n'aurait pas été libéré par le traitement électrohydraulique.

Les courbes de PCR obtenues avec l'échantillon traité par 200 décharges haute tension avec une hauteur de solution de 30 mm au-dessus des électrodes de la cuve sont présentées et annotées en Figure 84.

Chapitre 5 – Application de la technique de lyse à des bactéries

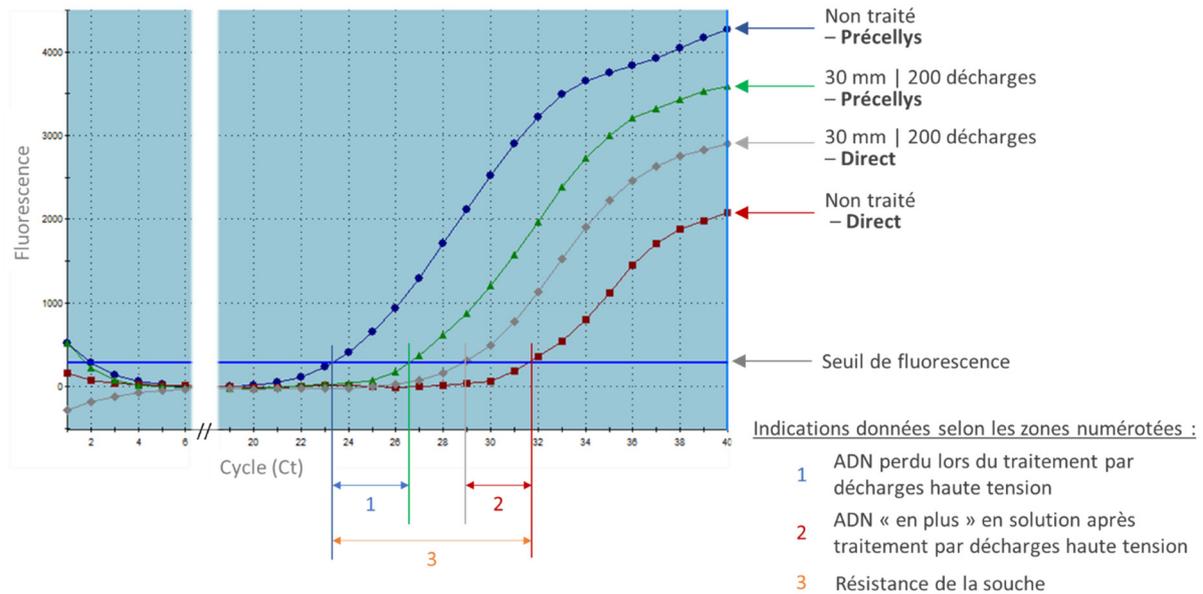


Figure 84 : Courbes de PCR annotées pour l'échantillon traité par 200 décharges avec une hauteur de solution de 30 mm.

Ainsi en PCR Direct, l'écart entre le nombre de cycles de réplication nécessaire à la détection de l'ADN dans l'échantillon non traité et celui dans l'échantillon traité par 200 décharges donne une information concernant la quantité d'ADN extraite par le traitement électrohydraulique.

En PCR après Précellys en revanche, l'écart entre le nombre de cycles de réplication nécessaire à la détection de l'ADN dans l'échantillon non traité et celui dans l'échantillon traité par 200 décharges indique que l'échantillon contient globalement moins d'ADN après le traitement électrohydraulique. Cet écart entre les nombres de cycles de réplication donne une information concernant la quantité d'ADN perdu lors de ce traitement.

En outre, pour l'échantillon non traité par les décharges haute tension, l'écart entre le nombre de cycles de réplication nécessaire à la détection de l'ADN en PCR Direct et en PCR après Précellys donne une information concernant la résistance et la bonne santé de la souche utilisée. Pour chaque acquisition cet écart est mesuré afin de valider les résultats obtenus.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette expérience est consigné dans le Tableau 4.

Les résultats obtenus par PCR Direct montrent que plus les échantillons ont subi des décharges électriques, plus la quantité initiale d'ADN en solution est importante. Ainsi, après un traitement électrohydraulique dans la cuve remplie de 30 mm de solution, le seuil de détection est atteint avec 1,1 cycles pour un traitement par 10 décharges et 2,8 cycles pour un traitement par 200 décharges d'avance sur l'échantillon non traité. Dans la cuve remplie de 8 mm de solution, le seuil de détection est atteint encore plus rapidement en PCR avec 4,2 cycles (pour 200 décharges) d'avance sur l'échantillon non traité.

En sens contraire, les résultats en PCR après **Précellys** montrent que les quantités d'ADN initiales diminuent lorsque le nombre de décharges électriques augmentent, quel que soit le niveau de remplissage des cuve de traitement. Ces « PCR après Précellys » suggèrent donc une perte de l'ADN associée aux décharges.

PCR Direct			
Hauteur de solution dans la cuve	Nombre d'impulsions lors du traitement	Nombre de cycles pour atteindre le seuil de détection	Cycles d'avance sur l'échantillon non traité
-	0	31,6	-
30 mm	10	30,4	1,1
30 mm	100	28,8	2,8
30 mm	200	28,8	2,8
8 mm	10	29,6	2,0
8 mm	100	28,8	2,8
8 mm	200	27,4	4,2

PCR après Précellys			
Hauteur de solution dans la cuve	Nombre d'impulsions lors du traitement	Nombre de cycles pour atteindre le seuil de détection	Cycles de retard sur l'échantillon non traité
-	0	23,2	-
30 mm	10	23,9	0,7
30 mm	100	24,0	0,8
30 mm	200	26,5	3,3
8 mm	10	25,5	2,3
8 mm	100	26,5	3,3
8 mm	200	26,6	3,4

Tableau 4 : Résultats de PCR des échantillons *B. subtilis* traités. L'échantillon non traité par impulsions haute tension sert de référence pour comparaison avec chaque échantillon traité.

2.3.2. Calcul d'un rendement d'extraction

A partir des résultats obtenus précédemment et consignés dans le tableau ci-dessus, il est possible de calculer des rendements d'extraction de l'ADN. Dans un premier temps, il est nécessaire de corriger les cycles d'écart mesuré entre les échantillons traités et l'échantillon non traité. En effet, si l'analyse après Précellys des échantillons traités par des décharges haute tension suggère une dégradation de l'ADN extrait, il est possible de quantifier cette perte d'ADN et de l'ajouter à la valeur mesurée d'ADN extrait et présent en solution lors de la PCR Direct.

A partir de l'équation 5.2, un rendement d'extraction peut être calculé en prenant pour référence l'échantillon traité par l'action du Précellys.

$$\gamma = \frac{n_{\text{échantillon}}}{n_{\text{Précellys}}} = 2^{\text{cycles détection Précellys} - \text{cycles détection échantillon}} \quad (5.3)$$

Le tableau 5 donne les valeurs calculées des rendements d'extraction des échantillons en fonction des différents traitements effectués. Pour chaque échantillon, deux types de rendements sont calculés : un premier dit « brut » ; un second dit « corrigé », tenant compte de l'ADN perdu au cours du traitement par les décharges haute tension.

Traitement (hauteur nombre de décharges)	Cycles détection	Cycles détection corrigé	Rendement d'extraction « brut »	Rendement d'extraction « corrigé »
0	31,6	-		
30 mm 10	30,4	29,8	1 %	1 %
30 mm 100	28,7	28	2 %	4 %
30 mm 200	28,8	25,5	2 %	21 %
8 mm 10	29,6	27,3	1 %	6 %
8 mm 100	28,8	25,5	2 %	21 %
8 mm 200	27,4	24,1	6 %	57 %
Précelllys	23,2	-	100 %	100 %

Tableau 5 : Rendements d'extraction calculés à partir des résultats de PCR présentés dans le tableau.

Les rendements d'extraction calculés sont à première vue relativement faibles, entre 2 et 6 % dans les cas les plus favorables. Cependant, en tenant compte de l'ADN perdu au cours du traitement, il est possible de corriger ces rendements d'extraction. Il apparaît alors que le traitement par décharges haute tension permet de libérer jusqu'à près de 60 % de l'ADN. Il est donc intéressant à présent de comprendre l'origine de ces pertes et de chercher à les éviter.

2.4. Caractérisation des pertes d'ADN au cours du traitement par décharges

Ce paragraphe présente les résultats obtenus à partir d'ADN en solution. L'ADN utilisé est un amplicon de PCR (Sm) et sa concentration dans la solution est mesurée à l'aide du bioanalyseur. Les mesures ont été effectuées dans deux types de cuves remplies avec une hauteur de solution de 19 mm au-dessus des électrodes : une cuve en COC et une cuve fabriquée par stéréolithographie. Les échantillons traités par des décharges haute tension ont subi 200 décharges. Pour les deux types de cuves, un traitement en présence de BSA (Bovin Serum Albumin) censé limiter les pertes d'ADN par adsorption sur les parois a également été effectué (Man et col., 2013). La concentration en BSA de ces échantillons est de 0,02% en masse.

2.4.1. Analyse sur gel d'agarose

Les échantillons ont été observés sur un gel d'agarose après migration par électrophorèse. Il est ainsi possible d'estimer la taille et la concentration des fragments d'ADN présent en solution. L'aspect du gel après migration est présenté en Figure 85.

Les résultats se lisent en colonne sur le gel : chaque colonne numérotée correspond à un échantillon. Sous un rayonnement ultra-violet, chaque fragment apparaît sous forme d'une bande blanche dont l'intensité est directement liée à sa concentration. La longueur du fragment peut être estimée par comparaison avec les bandes de la colonne 1, obtenue à partir un ladder composé d'un nombre fini de fragments de tailles connues.

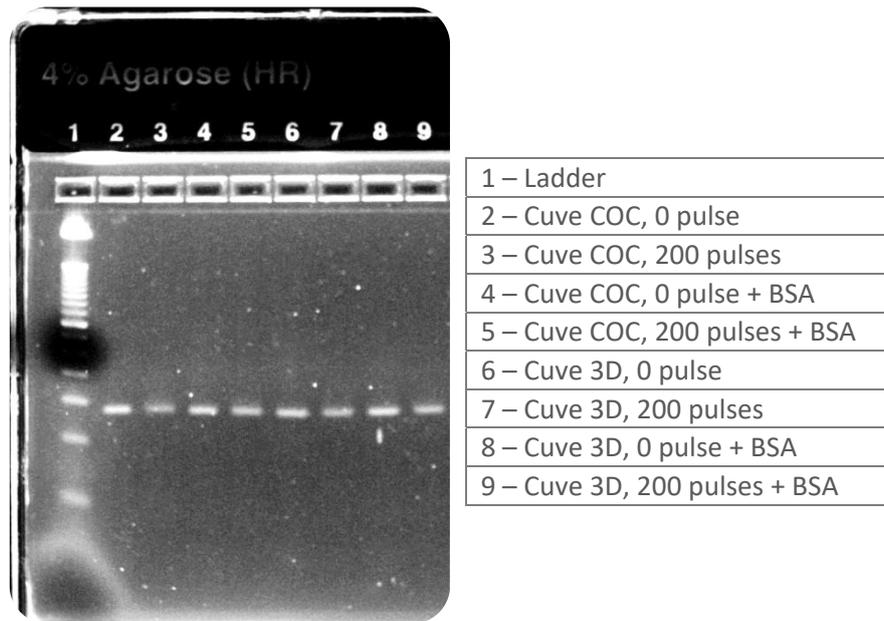


Figure 85 : Gel d'agarose révélé sous UV après migration des brins d'ADN.

Tous les échantillons analysés présentent une unique bande à mi-hauteur du gel. D'après le ladder, cette bande correspond à un fragment d'environ 140 bases. Ce résultat indique que la séquence d'ADN introduite en solution n'a pas été « coupée » lors du traitement par décharges haute tension. Concernant l'intensité des bandes, les fragments des échantillons 2, 4, 6 et 8, non traités, apparaissent avec des intensités fortes et voisines. Les bandes des échantillons 5, 7 et 9 correspondant aux échantillons traités respectivement avec BSA dans la cuve en COC, sans BSA et avec BSA dans la cuve conçue par stéréolithographie, sont semblables et moins intenses. Enfin la bande la moins intense est visible dans la colonne 3 correspondant à l'échantillon traité dans la cuve en COC sans BSA.

2.4.2. Analyse à l'aide d'une biopuce

Les échantillons préparés ont également été analysés à l'aide d'une biopuce présentée en section 1.5.3. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 6.

Dans la cuve en COC		
	Sans BSA	Avec BSA
Non traité	1,38 ng/μL	1,31 ng/μL
200 décharges	0,46 ng/μL	1,00 ng/μL
	Pertes sans BSA 0,92 ng/μL	Pertes avec BSA 0,31 ng/μL

Dans la cuve fabriquée par stéréolithographie		
	Sans BSA	Avec BSA
Non traité	1,31 ng/μL	1,10 ng/μL
200 décharges	0,88 ng/μL	0,74 ng/μL
	Pertes sans BSA 0,43 ng/μL	Pertes avec BSA 0,36 ng/μL

Tableau 6 : Concentrations massiques d'ADN de *Serratia marcescens* détectés par le bioanalyseur.

La concentration initiale des fragments d'ADN est mesurée à environ 1,35 ng/μL (sauf dans la cuve fabriquée par stéréolithographie, en présence de BSA, où la concentration initiale du fragment est mesurée à 1,10 ng/μL).

Après traitement des solutions d'ADN par les décharges haute tension, les concentrations chutent dans tous les cas. Dans la cuve en COC, sans BSA, les pertes sont de 0,92 ng/μL soit 67%, contre 0,31 ng/μL (24%) en présence de BSA. Dans la cuve fabriquée par stéréolithographie, les pertes sont de 0,43 ng/μL (33%) et 0,36 ng/μL (33%) respectivement en l'absence et en présence de BSA.

Ces résultats, sensibles aux matériaux utilisés pour la fabrication de la cuve et à la présence de BSA, semblent donc indiquer que l'ADN est perdu par adsorption lors du traitement.

2.5. Impact de l'écart entre les pointes des électrodes et ajout de BSA

Avec pour objectif la poursuite d'une étude paramétrique, l'écartement entre les électrodes est désormais modifié. Quatre cuves ont été fabriquées avec des écartements différents entre les pointes. Ces écartements ont été fixés à 1 mm ; 2 mm ; 3 mm et 4 mm.

Suivant les conclusions précédentes, de la BSA est ajoutée à l'échantillon afin de limiter les pertes par adsorption. La composition de l'échantillon à traiter est donc : 1 mL de bactéries *B. subtilis* en solution avec 22 μL de BSA à 1%. Les échantillons ont été traités par des impulsions de 50 μs à 10 kV répétées 200 fois. Les cuves sont remplies de solution contenant les bactéries à lyser jusqu'à une hauteur de 8 mm au-dessus des électrodes.

L'intérêt de ce paragraphe est double puisque les manipulations ont été effectuées en présence de BSA suite aux résultats du paragraphe précédent ; lors des calculs de rendements d'extraction à partir de la quantité d'ADN libéré, ceux-ci doivent *a priori* être supérieurs à ceux obtenus dans le paragraphe 2.3.

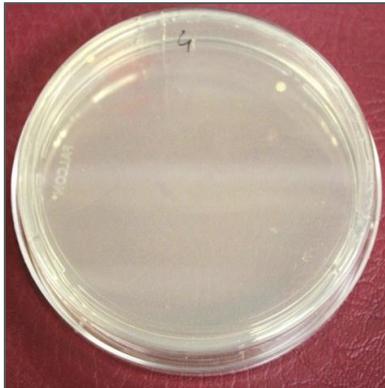
2.5.1. Cultures sur boîtes de Pétri

L'évolution de chacune des cultures est présentée sur les photos ci-dessous en Figure 86.

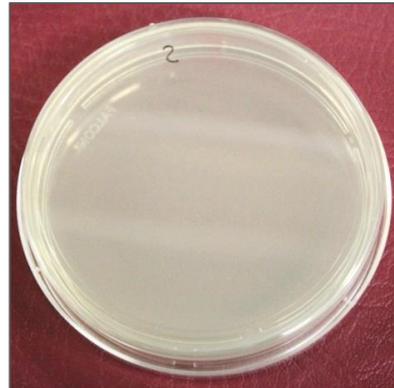
Les boîtes de Pétri restent intactes, aucune des cultures n'a réussi à former des colonies. Les bactéries sont donc incapables de se reproduire après traitement et cela pour tous les écartements entre les électrodes testés.



Non traité



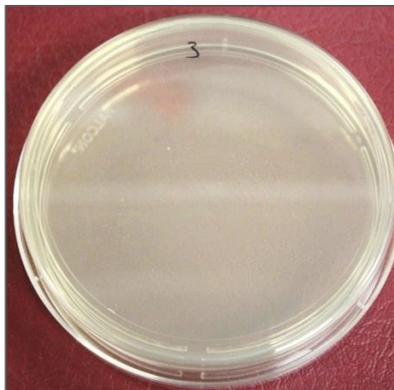
Ecartement entre les électrodes : **1 mm**



Ecartement entre les électrodes : **2 mm**



Ecartement entre les électrodes : **3 mm**



Ecartement entre les électrodes : **4 mm**

Figure 86 : Photographies des boîtes de Pétri après incubation des échantillons *B. subtilis* traités avec différents écarts entre les pointes des électrodes.

2.5.2. Résultats de PCR

Les résultats obtenus en PCR quantitative à partir des échantillons précédents sont présentés dans le Tableau 7.

Cuve utilisée	Seuil de détection (nombre de cycles)	Rendement
<i>Traité par précellys</i>	18,7	-
Cuve 1 mm	20,2	34 %
Cuve 2 mm	19,7	49 %
Cuve 3 mm	20,2	36 %
Cuve 4 mm	21,7	13 %

Tableau 7 : Résultats de PCR des échantillons *B. subtilis* traités avec différents écarts entre les pointes des électrodes.

Pour les échantillons traités dans des cuves dont l'écartement entre les électrodes est inférieur ou égal à 3 mm, les seuils de détection de la fluorescence mesurée en PCR sont atteints quasiment au même moment que pour l'échantillon traité par le Précellys (cf. Tableau 7). L'écart mesuré entre le Précellys et les échantillons cités, compris entre 1 et 1,5 cycles, tient compte de l'erreur de la mesure que l'on estime proche de 0,5 cycle. La quantité d'ADN libéré par les échantillons cités est donc très proche de la quantité d'ADN libéré lors du traitement par le Précellys.

En outre, ces résultats confirment aussi l'amélioration des rendements d'extraction en présence de BSA. En effet, en comparant le rendement « brut » obtenu dans ce paragraphe pour un écartement de 1 mm avec celui calculé dans le paragraphe 2.3.2 dans les mêmes conditions (200 décharges et 8 mm de solution au-dessus des électrodes), les valeurs passent de 6 % à 34 % d'extraction. Ce résultat confirme ceux obtenus dans le paragraphe 2.4.

3. Discussions

Dans un premier temps, les résultats qualitatifs obtenus avec la technique innovante de lyse proposée ont permis de vérifier l'impact des impulsions haute tension sur des souches de bactéries végétatives. Ces résultats ont pu être obtenus avec deux types de bactéries : des bactéries gram positives lors des tests avec *B. subtilis* et des bactéries gram négatives avec la souche *E. coli*. Ces deux souches diffèrent fondamentalement par la présence d'une seule membrane pour *B. subtilis* contre l'existence de deux membranes dans le cas de *E. coli*. Cette dernière est bien apparue plus résistante au traitement, cependant les mêmes tendances sont remarquables dans les résultats obtenus.

Le développement des cultures de bactéries après traitement par les décharges haute tension permet d'avoir une idée du taux d'inhibition de la culture des bactéries lors du traitement. Conformément aux résultats obtenus avec des microalgues dans le chapitre précédent, il apparaît que plus les impulsions sont répétées lors du traitement, plus le taux de destruction des bactéries est élevé, celles-ci n'étant alors plus capables de se reproduire pour former des colonies lorsqu'elles sont à nouveau mises en culture.

En revanche, il apparaît aussi que l'efficacité du traitement dépend du niveau de remplissage de la cuve dans laquelle celui-ci a lieu. Si l'efficacité du traitement reste liée au nombre d'impulsions subi par l'échantillon, il semble que le traitement est également plus efficace lorsque la cuve est peu remplie. Le niveau de remplissage doit cependant toujours respecter la condition que les électrodes soient placées au-dessous de la surface du liquide, sans quoi le claquage diélectrique est impossible.

L'impact des impulsions haute tension a dans un second temps été testé en quantifiant l'ADN de la souche traitée présent dans le surnageant de la solution. Cette quantité d'ADN, mesurée par PCR en temps réel, permet d'estimer le taux d'ouverture des bactéries présentes dans la solution, l'ADN étant initialement contenu à l'intérieur de la bactérie. Dans un premier temps les résultats de PCR ont permis de démontrer qu'après traitement par les impulsions haute tension, la quantité d'ADN en solution de

la souche augmente. Le traitement est donc efficace pour libérer le contenu de la bactérie. En outre, il semble que la quantité d'ADN libéré est directement liée au nombre d'impulsions répétées au cours du traitement. Ce résultat permettant d'obtenir une preuve de concept du dispositif de lyse, ce dispositif a par la suite été caractérisé et optimisé.

La première étape de caractérisation du dispositif a été une comparaison avec d'autres techniques de lyse utilisées dans le laboratoire. Il s'agit en fait de deux types de lyse : l'une par voie mécanique au moyen d'un appareil commercial, le *Précellys 24*, l'autre par voie thermique, en chauffant l'échantillon. Le taux d'ouverture obtenu avec le *Précellys* est considéré proche de 100%, et les résultats obtenus avec cet appareil ont servi de référence lors des expériences menées avec le dispositif en développement. Lors de cette caractérisation, il a été possible de mettre en évidence des taux d'ouverture de l'ordre de 60% à l'aide d'un traitement par 200 impulsions. Les résultats obtenus en chauffant les échantillons ont permis de montrer que les souches utilisées pour ces manipulations sont thermorésistantes, le rendement d'extraction par voie thermique étant proche de 0%. Cette série de manipulations montre également que l'efficacité de la lyse - au sens « d'extraction du contenu » - augmente lorsque le volume de solution traitée diminue. Ce résultat va dans le même sens que celui obtenu précédemment par culture des bactéries traitées. Les valeurs des rendements d'extraction calculés ont d'abord été calculés idéalement en tenant compte des pertes au cours du traitement.

Deux hypothèses ont été avancées concernant l'origine de ces pertes : soit il y a dégradation de l'ADN lors du traitement par les impulsions haute tension (l'ADN étant alors dénaturé et éventuellement coupé en fragments de plus petites tailles), soit l'ADN est adsorbé sur les parois de la cuve. Lors de la migration sur gel d'agarose de l'échantillon traité contenant l'ADN en solution, aucun fragment de petite taille n'est visible, ce qui va à l'encontre de perte par fragmentation de l'ADN lors du traitement par les impulsions haute tension. La seconde hypothèse a été vérifiée par l'ajout de BSA (Bovine Serum Albumin), un agent anti-adsorption intéressant. Les résultats obtenus avec un échantillon d'ADN en solution sont en faveur d'une perte majoritairement par adsorption. Les résultats obtenus avec les cuves fabriquées par stéréolithographie montrent également que les pertes diminuent lorsque le matériau utilisé change, ce qui renforce l'idée d'une adsorption sur les parois du matériau.

Par conséquent, l'ajout de BSA à une concentration finale de 0,02 % dans les cuves en COC est proposée dans le futur pour extraire l'ADN. Enfin l'utilisation de cuves en photopolymère LS600 empêche la visualisation du contenu de la cuve au cours du traitement, mais ce type de matériau pourra également être choisi dans une application industrielle.

Chapitre 6

Perspectives applicatives du procédé

La technique de lyse par décharges haute tension a désormais été caractérisée dans des conditions de laboratoire. Des résultats encourageants ont été obtenus sur différentes souches de microalgues productrices d'huile et de bactéries.

Cependant, le dispositif actuel permet uniquement la lyse d'un échantillon placé dans une cuve. Afin de se rapprocher d'applications concrètes, des fonctions supplémentaires fondées également sur les décharges haute tension vont être explorées dans ce chapitre en modifiant le dispositif initial. Ces fonctions sont de deux types :

- *Récupération du lysat et renouvellement du fluide à lyser*
- *Réalisation d'une analyse in situ.*

1. Conception d'un système de pompage pour la bioproduction

1.1. La vanne capillaire

Afin de concevoir un dispositif qui permette le renouvellement de fluide, les effets de capillarité ont été exploités pour mettre au point une vanne capable de s'ouvrir après une décharge électrique puis se refermer ; l'énergie nécessaire à la manipulation de cette vanne provient donc uniquement de la décharge haute tension. Ce système, dont le principe est rapporté dans la littérature, porte le nom de « vanne capillaire » (Glière & Delattre, 2006).

1.1.1. Rappels sur les angles de contact

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide, deux situations peuvent se présenter :

- Si la surface est très hydrophile, le liquide s'étale sur toute la surface. On parle alors de mouillage total.
- Si la surface est moins hydrophile ou bien hydrophobe, le liquide forme une goutte sur la surface. On parle de mouillage partiel.

Les matériaux utilisés dans ce travail de thèse n'étant pas très hydrophiles, seule la situation de mouillage partiel sera étudiée.

1.1.1.1. Loi de Young-Dupré

Lors de la formation de la goutte, un angle de contact apparaît au niveau de la ligne triple, c'est-à-dire au contact entre le liquide, le solide et le gaz environnant. Cet angle de contact est spécifique aux différents matériaux en jeu (le liquide, la surface solide et le gaz environnant) et peut-être mesuré. Les interactions entre les différents matériaux sont caractérisées par des constantes appelées tensions superficielles notées γ_{lg} , γ_{gs} , γ_{ls} pour désigner respectivement les interactions liquide/gaz, gaz/solide et liquide/solide. En première approximation il peut être intéressant de noter la loi de Young-Dupré qui lie ces constantes et l'angle de contact formé au niveau du point triple :

$$\gamma_{lg} \times \cos \theta = \gamma_{gs} - \gamma_{ls} \quad (6.1)$$

Pour ce qui nous concerne, la mesure de cet angle a été effectuée à l'aide de l'instrument Drop Shape Analyser (Krüss DSA 100) qui permet d'acquérir des images faisant apparaître les angles de contact en deux points (gauche et droit) ; des différences peuvent apparaître entre ces deux points et l'angle retenu est la moyenne de ces deux mesures (cf. Figure 87).

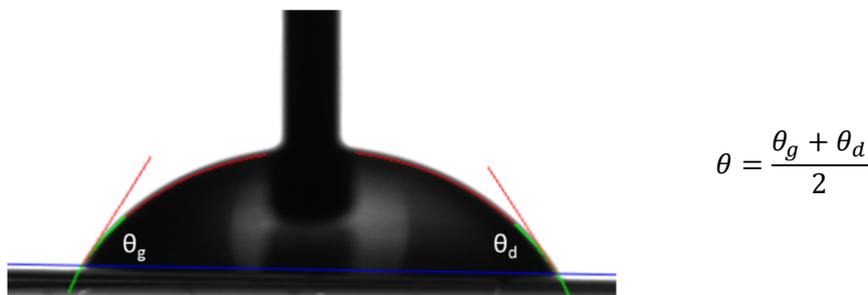


Figure 87 : Mesure des angles de contact gauche et droit d'une goutte d'eau sur du plexiglas à l'aide de l'analyseur DSA 100 de Krüss.

1.1.1.2. Phénomène d'hystérèse

Lorsque l'on modifie le volume V d'une goutte (gonflement ou rétraction), l'angle de contact peut prendre des valeurs comprises entre deux extremums sans que la ligne triple ne bouge. Au-delà de ces angles extremums la ligne triple se déplace et les angles de contact prennent des valeurs appelées *angles avançant* et *angle reculant*, notés θ_a et θ_r , dépendant de la vitesse de déplacement de la ligne triple, résultant respectivement du gonflement et de la rétraction de la goutte (Dussan V., 1979).

Ainsi la situation au cours de laquelle l'angle de contact prend la valeur de l'angle avançant (respectivement reculant) correspond à un élargissement (respectivement rétrécissement) de la base de la goutte.

L'intervalle $[\theta_r ; \theta_a]$ dans lequel l'angle de contact peut évoluer sans déplacement de la ligne triple décrit un phénomène appelé hystérèse. Ce phénomène peut être visualisé sur la Figure 88 obtenue en faisant varier le volume d'une goutte d'eau sur une surface en plexiglas traitée par un dépôt de silane rendant la surface plus hydrophobe.

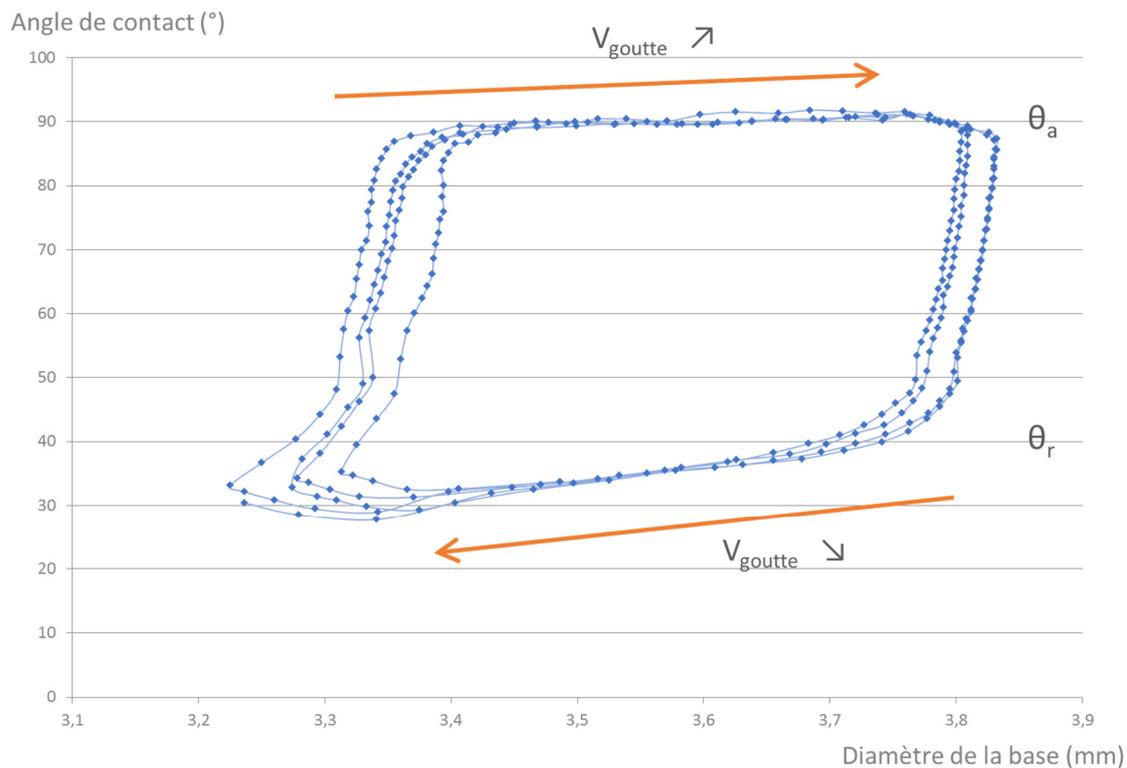


Figure 88 : Evolution de l'angle de contact en fonction du diamètre de la base de la goutte lorsque le volume de la goutte est modifié. Ces mesures sont obtenues à l'aide de l'analyseur Krüss DSA 100.

Ces différentes notions d'angles de contact abordées dans ce paragraphe pour une goutte peuvent être aisément transposées à une bulle accrochée à une paroi. Dans notre étude, c'est la valeur de l'angle avançant qui nous servira pour la mise au point d'un système de vanne fondé sur les effets capillaires.

1.1.2. Principe de la vanne capillaire

1.1.2.1. Loi de Laplace

En mécanique des fluides, la loi de Laplace est obtenue à partir d'un bilan normal des forces appliquées à une interface ; elle lie la courbure d'une interface entre deux milieux à la différence de pression entre ces deux milieux (appelée aussi pression de Laplace, cf. équation 6.2). Lorsque le rayon de courbure est grand, la pression de Laplace peut facilement être négligée ; en revanche à des échelles plus petites, en particulier en microfluidique, elle joue un rôle parfois prépondérant.

La vanne capillaire développée dans cette partie repose sur cette différence de pression liée à l'évolution du rayon de courbure du ménisque au niveau de la sortie d'une cuve conique lors de son remplissage. Le principe de la vanne est détaillé en Figure 89.

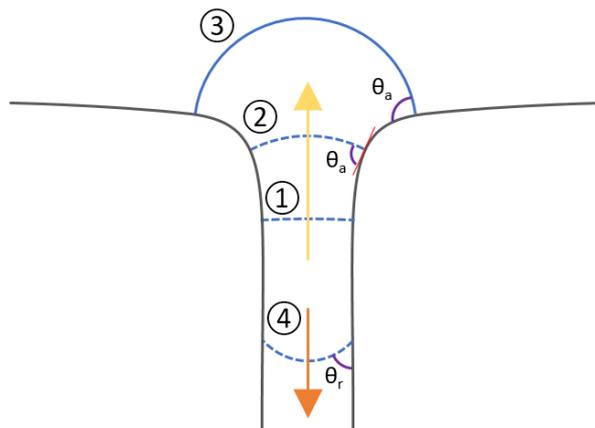


Figure 89 : Représentation schématisée de l'évolution du ménisque vu de très près lors du remplissage d'une embouchure s'élargissant subitement (situations ①, ② et ③) et lorsqu'elle se vide (④).

- ① Le niveau de remplissage de la cuve augmente, le ménisque avance vers la sortie en formant un angle de contact θ_a avec la paroi de la cuve appelé « angle avançant ». Dans cette situation le rayon de courbure du ménisque est très grand.
- ② Le niveau de remplissage continue d'augmenter, l'angle avançant est conservé, mais l'élargissement soudain du conduit fait chuter le rayon de courbure du ménisque. D'après la loi de Laplace (cf. équation 6.2), la différence de pression retenue par le ménisque augmente.
- ③ Le rayon de courbure atteint son minimum et l'angle de contact est toujours l'angle avançant. Cette situation correspond à la différence de pression maximale retenue au niveau de l'interface liquide/air. Si cette pression est dépassée, par exemple suite à la décharge électrique, le ménisque n'est plus retenu et une partie du liquide est éjectée.
- ④ Le liquide est aspiré vers le fond de la cuve et forme un angle de contact dit « angle reculant » avec la paroi de la cuve.

Vue de plus loin, la situation d'équilibre notée ① sur la Figure 89 est schématisée en Figure 90. Les lettres R ; r ; θ_a et β représentent respectivement le rayon de courbure de l'interface liquide/gaz, le rayon de l'orifice de sortie de la cuve, l'angle de contact avançant au niveau de la surface supérieure de la cuve, et l'angle entre la surface supérieure de la cuve et la paroi de la conduite de sortie.

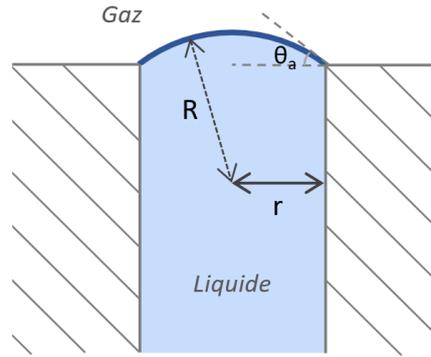


Figure 90 : Situation vue à l'échelle macroscopie correspondant à la rétention de liquide en surpression par effet capillaire (l'écartement entre les parois de la conduite a été agrandie exagérément pour le schéma).

D'après la loi de Laplace, la différence de pression entre l'air et l'eau retenue par la tension de surface au niveau du ménisque vaut :

$$\Delta P_b = \frac{2 \times \gamma_{l/g}}{R} \quad (6.2)$$

Où R est le rayon de courbure de l'interface liquide/gaz. A l'aide du schéma en Figure 90, R peut être remplacé par l'angle de contact θ et le rayon r de l'embouchure de façon à obtenir l'équation 6.3 :

$$\Delta P_b = 2 \times \gamma_{l/g} \times \frac{\sin(\theta_a)}{r} \quad (6.3)$$

Ainsi nous venons donc de voir qu'il est possible de retenir un liquide en surpression par rapport au gaz surplombant le ménisque au niveau de l'orifice de sortie.

1.1.2.2. Principe de fonctionnement du dispositif

A partir de la loi précédente, un système composé d'un réservoir placé au-dessus de l'orifice de sortie fût imaginé et fabriqué. La formation d'un ménisque au niveau de la sortie du cône permet de retenir à l'intérieur de la cuve de l'eau en surpression par rapport au milieu extérieur. Lors d'une décharge haute tension, une surpression supplémentaire entraîne l'éclatement du ménisque et le fluide est alors éjecté subitement. Le principe de ce système est expliqué en six étapes schématisées sur la Figure 91.

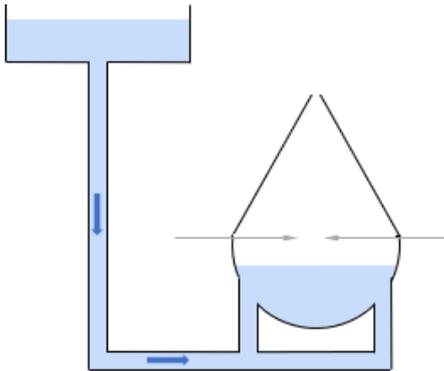
A partir de l'équation 6.3, il est possible d'établir une relation entre la hauteur maximale du réservoir et le diamètre de l'orifice de sortie :

$$\Delta P_b = 2 \times \gamma_{l/g} \times \frac{\sin(\theta_a)}{r} = \rho \times g \times h_{max} \quad (6.4)$$

C'est-à-dire :

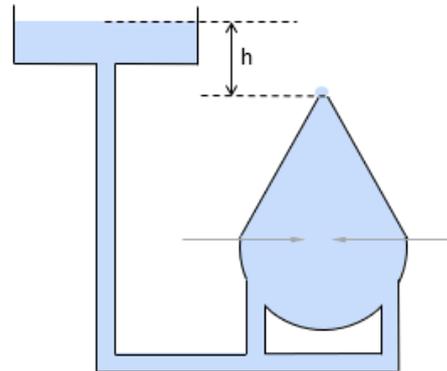
$$h_{max} = 2 \times \gamma_{l/g} \times \frac{\sin(\theta_a)}{\rho \times g \times r} \quad (6.5)$$

1) Remplissage de la cuve



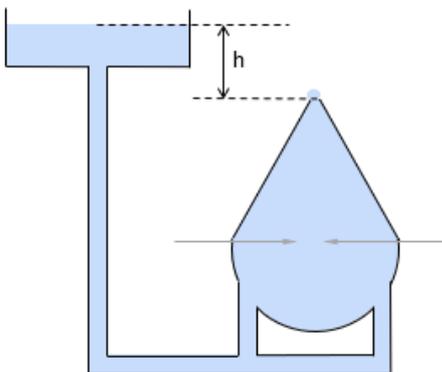
Le liquide remplit la cuve selon le principe des vases communicant, le réservoir étant placé plus haut que la cuve.

2) Fin du remplissage



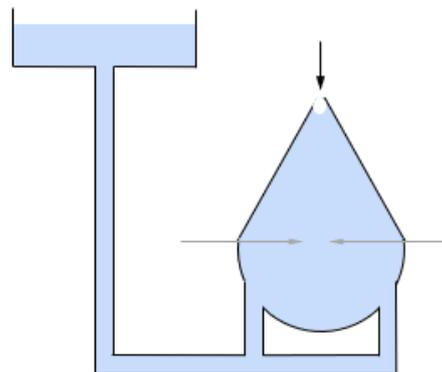
Le remplissage se poursuit jusqu'à la formation du ménisque au niveau de l'orifice de sortie capable de retenir une hauteur d'eau h.

3) Eclatement de la vanne



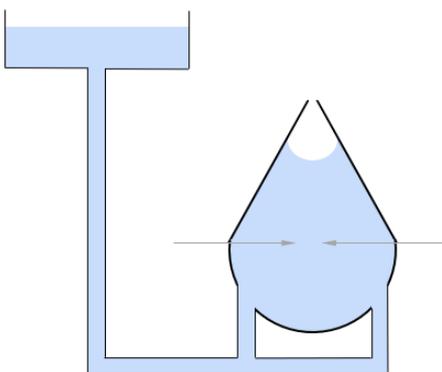
Lors de la décharge, la surpression créée à l'intérieur de la cuve dépasse la limite supportée par les effets capillaires et éjecte une partie du liquide par l'orifice.

4) Aspiration d'air



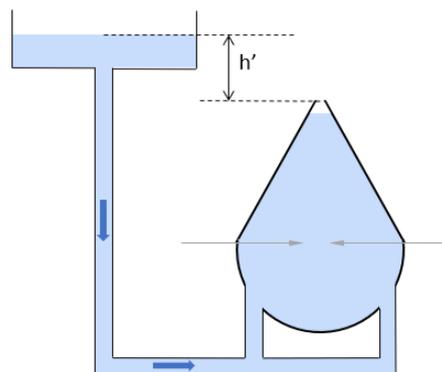
Rapidement après la décharge, une dépression, liée au collapse de la bulle formée au niveau des électrodes, a lieu dans la cuve et entraîne l'arrivée d'air par l'orifice.

5) Fin d'aspiration de l'air



Cette aspiration d'air s'achève après environ 100 ms.

6) Remplissage de la cuve



La cuve se remplit à nouveau de la même manière que dans l'étape 1.

Figure 91 : Principe de fonctionnement du dispositif imaginé fondé sur la vanne capillaire.

1.2. Conception et fabrication d'une cuve

1.2.1. Choix des dimensions

La forme conique qui apparaît dans les schémas de la Figure 91 a été choisie afin de faire converger les ondes de choc vers l'orifice de sortie et faciliter l'éjection du liquide. Des modèles simples ont été adoptés pour visualiser le parcours de ces ondes en considérant que ces dernières se réfléchissent symétriquement par rapport à la normale sur une paroi. L'étude de leurs trajectoires, présentées en Figure 92, a permis de fixer les paramètres géométriques du cône : ses parois forment un angle de 60° par rapport à l'horizontale, la partie inférieure est sphérique avec un rayon de courbure de 5,4 mm, et sa section est un disque de 5 mm de rayon. Le foyer des électrodes est centré au sommet de la base sphérique.

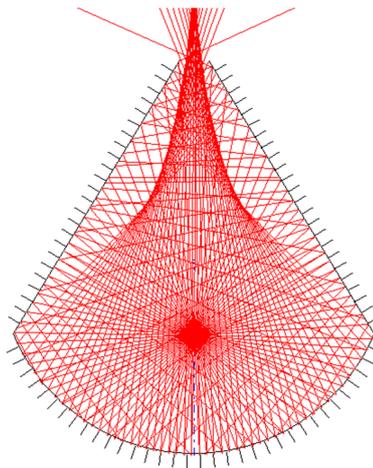


Figure 92 : Trajectoires typiques d'ondes de choc dans la cuve conique retenue.

A partir de la loi de Laplace-Young, nous avons vu qu'il est possible de relier le rayon de l'orifice de sortie à la hauteur d'eau maximale au-dessus de l'orifice pouvant être retenue par les forces capillaires (cf. équation 6.5). En considérant l'angle mesuré de 91° (cf. Figure 87) la Figure 93 présente la hauteur d'eau maximale qui peut être retenue en fonction du rayon de l'orifice.

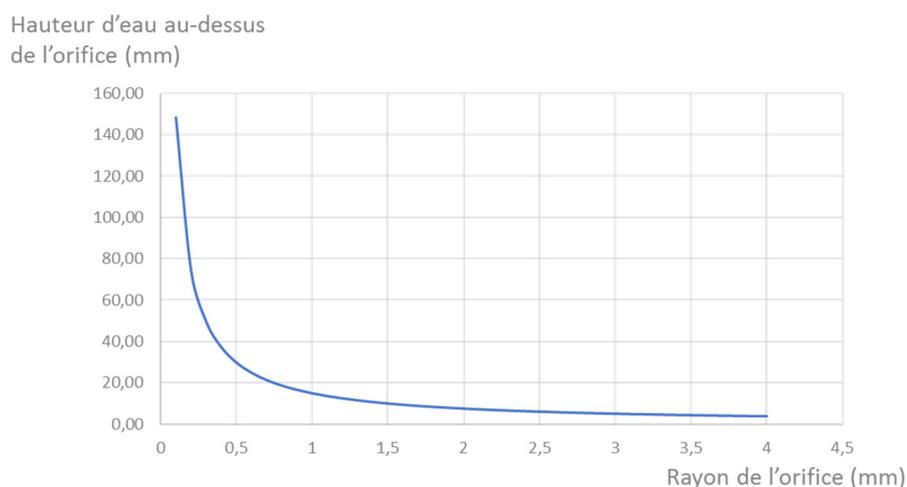


Figure 93 : Hauteur d'eau maximale retenue par les forces capillaires en fonction du rayon de l'orifice de sortie de la cuve.

Le rayon de l'orifice de sortie choisi égal à 0,4 mm peut retenir une hauteur d'eau d'environ 37 mm.

1.2.2. Matériels et méthodes

La cuve a été fabriquée dans une pièce cylindrique en plexiglas de 20 mm de diamètre et 22 mm de hauteur (cf. Figure 94). Afin d'augmenter l'hydrophobicité de la surface jusqu'à obtenir un angle d'avancé d'environ 91° , une silanisation a été réalisée en phase gazeuse. Les électrodes, identiques à celles utilisées dans la cuve en U, ont été insérées et collées de la même façon que celle décrite dans le chapitre 2. Des tuyaux d'un diamètre interne de 1 mm ont également été collés à la base de la cuve afin de permettre l'alimentation en liquide selon la description donnée précédemment (cf. Figure 91). L'assemblage final est photographié ci-dessous :

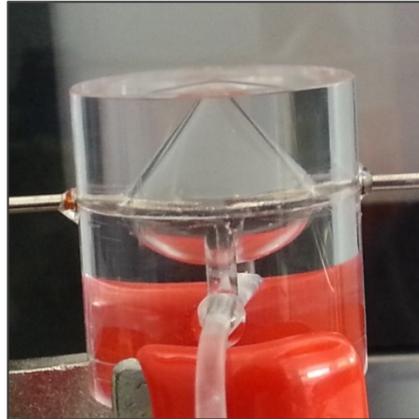


Figure 94 : Photographie du dispositif fabriqué.

1.3. Résultats et discussions

L'étude est poursuivie en observant le comportement du système lorsque les décharges haute tension sont engendrées afin de vérifier qu'il correspond bien à celui attendu.

1.3.1. Ejection du liquide

Le sommet de la cuve est filmé à l'aide de la caméra rapide FastCam SA1.1 selon le dispositif décrit dans le chapitre 2. Les images obtenues, enregistrées à 100 000 images par seconde, sont présentées en Figure 95. Comme attendu, un certain volume de liquide est éjecté de la cuve lorsqu'une décharge haute tension est produite. Cet éjection a lieu sous la forme d'un jet vertical. Il est intéressant de noter que l'on peut observer la présence de « chapeaux » dans ce jet. Le premier est situé en tête du jet. Le second apparaît au moment du collapse de la bulle formée entre les électrodes (la durée de vie de la bulle inter-électrode est plus courte que celle observée dans les cuves présentées dans le chapitre 2). Les conditions d'apparition et de propagation de ces « chapeaux » pourrait être le sujet d'une étude ultérieure complexe.

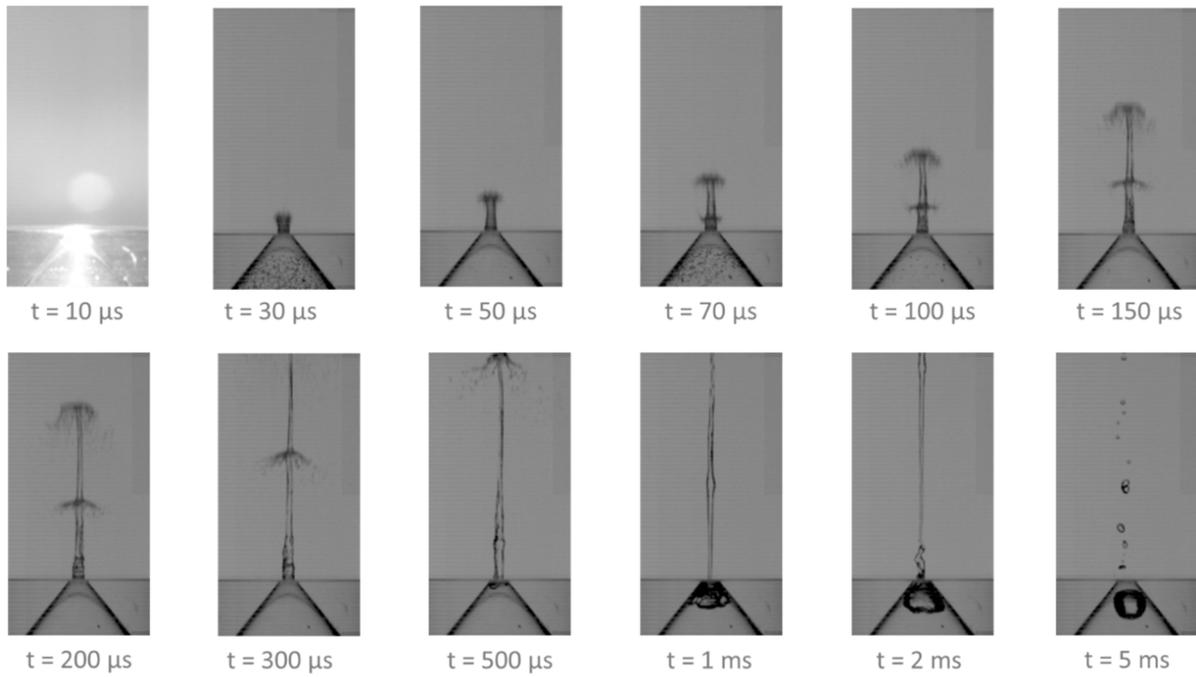


Figure 95 : Ejection du liquide à la sortie de la cuve à la suite d'une décharge haute tension filmée à 100 000 images par seconde.

1.3.2. Caractérisations

1.3.2.1. Volume de solution éjectée

Une première approximation a été effectuée pour obtenir un ordre de grandeur du volume éjecté : d'après les images présentées en Figure 95, le jet est assimilé à un cylindre de 0,4 mm de rayon (taille de l'orifice de sortie) et de 10 mm de hauteur. Le volume éjecté trouvé est alors d'environ 5 μL .

Une estimation a ensuite été réalisée en observant le déplacement de l'eau dans le tuyau d'alimentation au cours d'une séquence de 100 décharges à 10 Hz. Au terme de la séquence de décharges, un volume d'environ 450 μL (cf. Figure 96) a été déplacé. Cette mesure donne donc une estimation du volume éjecté égale à environ 4,5 μL par décharge.

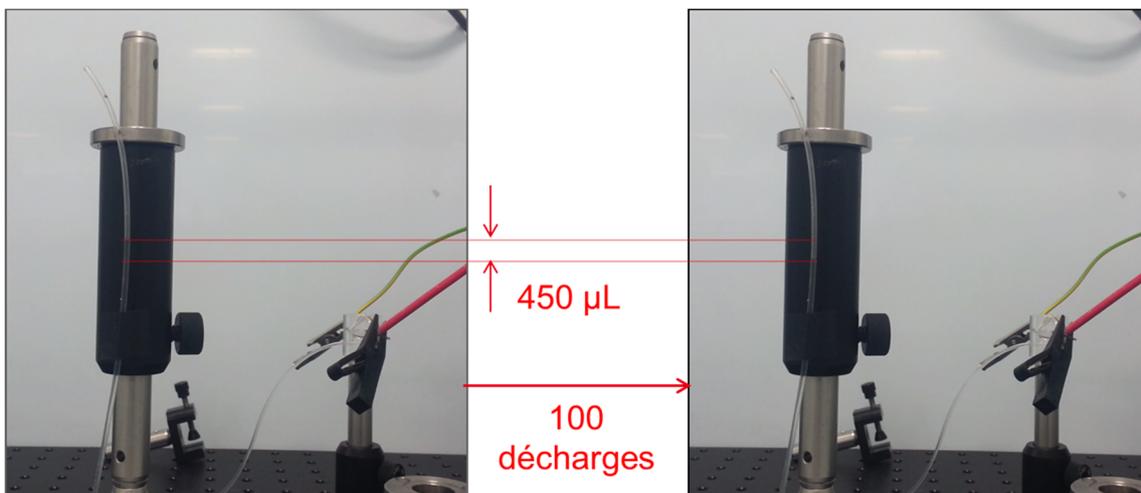


Figure 96 : Evolution de la quantité d'eau dans le tuyau d'alimentation au cours d'une séquence de 100 décharges haute tension.

1.3.2.2. Discussions

Une preuve de fonctionnement de la vanne capillaire imaginée a pu être obtenue suite à la fabrication et l'utilisation de la cuve conique présentée dans les paragraphes précédents. Cependant les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour plusieurs raisons :

- un problème de fiabilité apparaît rapidement lors de l'utilisation de la cuve : généralement cela se manifeste, après une centaine de décharges, par l'étalement d'une goutte sur la surface du cône. Le rayon de courbure du ménisque situé à la sortie du cône augmente et la pression retenue devient faible, laissant alors le liquide contenu dans le réservoir s'écouler (la vanne ne fonctionne plus). Les phénomènes à l'origine de cette observation doivent être recherchés afin d'y remédier ;
- en raison des difficultés liées à la variabilité des cultures de microalgues, la majorité des tests ont été effectués dans la configuration simple de la cuve en U (cf. section 2.2 du chapitre 2). L'étude entreprise ici doit être poursuivie avec des microorganismes à lyser.

1.4. Vieillessement de la cuve

Comme nous venons de le mettre en avant dans la cuve conique, lors de l'utilisation répétée d'une même cuve pour plusieurs expériences, des changements sont repérés. Cela est également vrai pour la cuve en U principalement utilisée dans cette étude ; suite à l'application de plusieurs centaines de décharges, le matériau (COC) constituant la cuve est dégradé et l'étanchéité diminue. Le comportement électrique change également : le claquage s'entend plus tardivement, puis de moins en moins en fréquemment (l'impulsion haute tension ne conduit plus au claquage diélectrique). En observant de près les électrodes il est alors possible de remarquer leur dégradation en comparant leur état dans une cuve neuve et celui dans une cuve ayant subi 2000 décharges (cf. Figure 97).

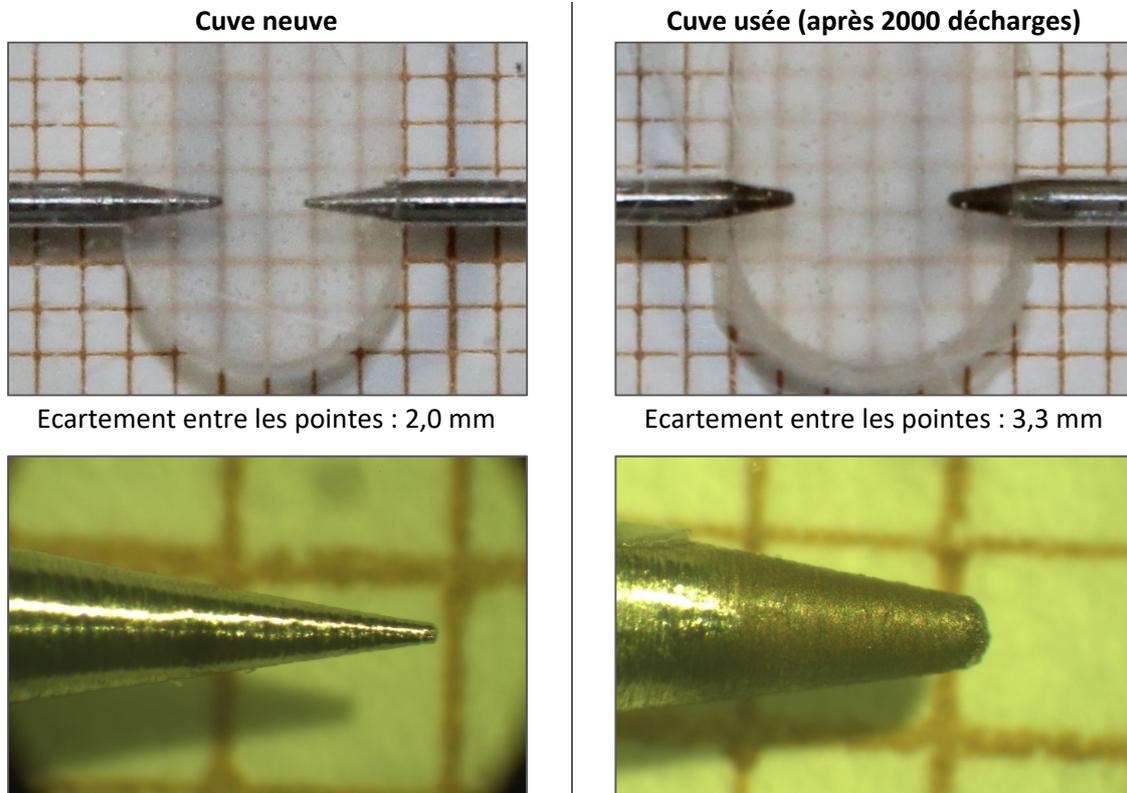


Figure 97 : Observations de l'usure des électrodes sur du papier millimétré : à gauche photographie d'électrodes neuves, à droite photographie d'électrodes ayant subi 2000 décharges.

Chapitre 6 – Perspectives applicatives du procédé

Les observations faites sur du papier millimétré à partir de la même cuve à différents temps d'utilisation mettent en évidence une augmentation de l'écartement entre les électrodes et une dégradation de la pointe de l'électrode. Après plusieurs décharges la pointe est érodée et son rayon de courbure augmente significativement.

Une étude plus quantitative dans une cuve dont les électrodes sont initialement espacées de 1 mm est alors effectuée. L'usure de la cuve est caractérisée à plusieurs étapes à l'aide de deux paramètres : l'écartement entre les pointes des électrodes et le temps de claquage. Ces caractérisations sont effectuées sur une cuve neuve subissant jusqu'à 3000 décharges de 30 μ s répétées par séries de 200 à 10 Hz. La mesure de l'écartement entre les électrodes est effectuée à la fin de chaque série. Les caractéristiques courant-tension des 32 dernières décharges de chaque série sont enregistrées et traitées. Le temps moyen de claquage sur ces 32 acquisitions est calculé. Les courbes obtenues sont présentées en Figure 98.

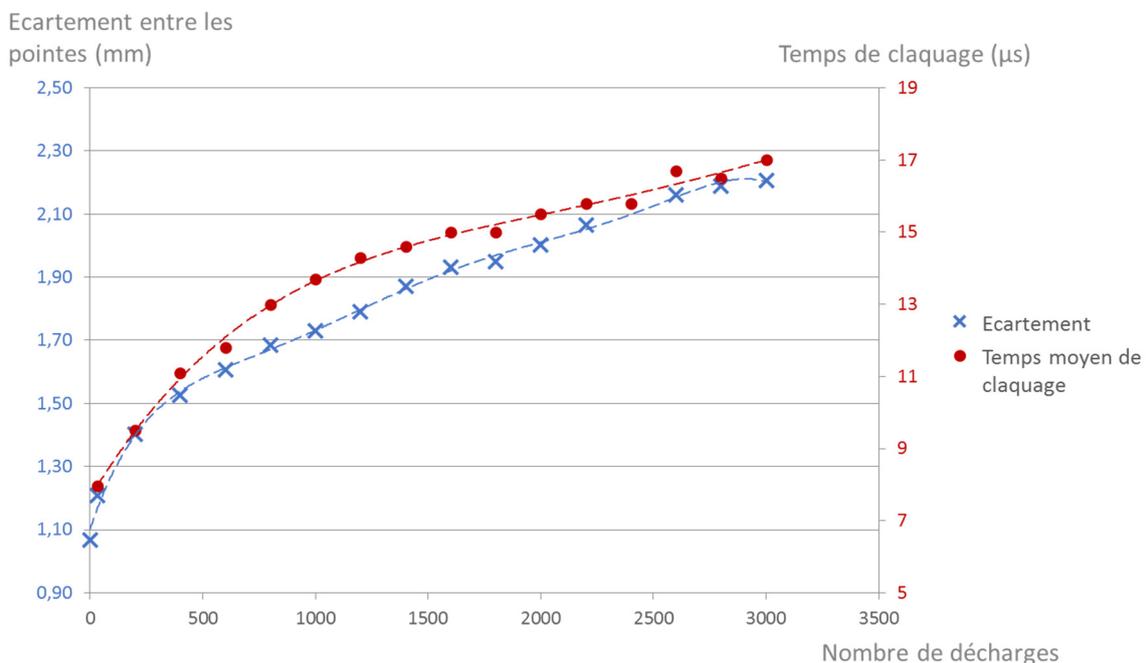


Figure 98 : Evolution de l'écartement entre les pointes des électrodes et du temps de claquage en fonction du nombre de décharges subies par la cuve.

Sur ce graphique, il apparaît qu'après une centaine de décharges, l'écartement entre les pointes augmente quasi-linéairement avec le nombre de décharges (cf. Figure 98). Si cette usure des électrodes peut être bénéfique lorsque l'on cherche à chauffer le liquide (cf. paragraphe 2.1), elle pose aussi plusieurs problèmes :

- A partir d'un certain niveau d'usure, l'état des pointes (écartement et rayon de courbure) ne permet plus le claquage systématique du liquide lors de l'impulsion haute tension.
- L'augmentation du rayon de courbure des pointes rend la position de l'arc électrique plus aléatoire lors du claquage. La variabilité des phénomènes engendrés, comme la formation d'une bulle de vapeur et la production d'ondes de pression, augmente.
- La détérioration des électrodes entraîne la libération de matériau dans la solution (sous forme de bâtonnets métalliques par exemple, cf. Figure 99). Dans cette étude l'impact de la présence de ces particules métalliques en solution n'a pas été évaluée, mais elle peut poser certains problèmes en particulier lorsqu'un très grand nombre de décharges sont produites dans la cuve.

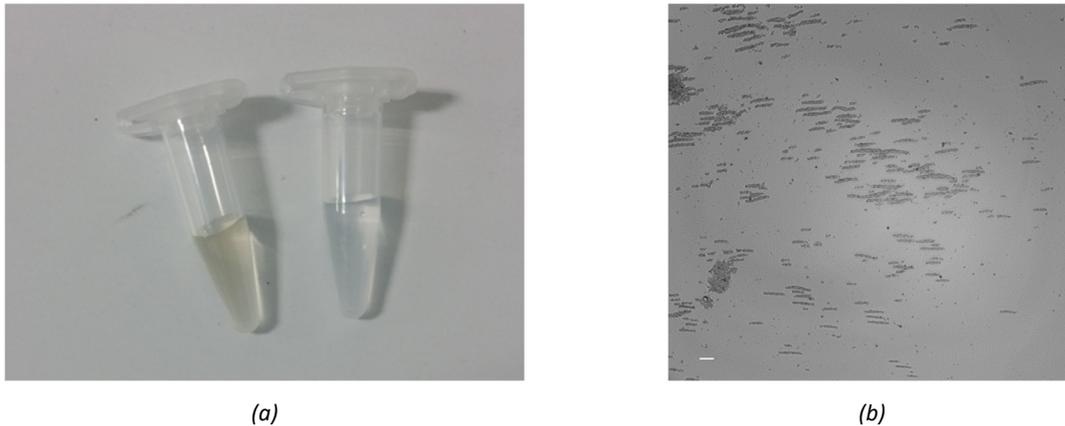


Figure 99 : Observations d'échantillons d'eau ayant subi 3000 décharges dans la cuve : (a) dans un microtube : le tube de gauche contient l'eau traitée, le tube de droite l'eau non traitée. (b) au microscope optique sur lame de verre. La barre blanche représente 100 μm .

Une étude plus approfondie des conséquences de l'usure des électrodes devrait être effectuée, notamment pour caractériser les particules relarguées en solution et leur impact. En outre il conviendra d'utiliser un matériau plus résistant pour fabriquer les baguettes pointues jouant le rôle d'électrodes. Ce matériau pourrait par exemple être du titane (Han et col., 2003) ou du tungstène, dont les points de fusion à pression atmosphérique sont respectivement de 1670°C et 3420°C.

2. Etude d'un système d'analyse in situ par amplification isotherme

L'apport de chaleur lors du traitement par les décharges haute tension augmente significativement la température de la solution dans la cuve (cf. Chapitre 3). Dans ce paragraphe, une étude thermique est d'abord effectuée afin de cerner précisément les possibilités thermiques de notre dispositif. Par ailleurs, rappelons que l'un de nos objectifs principaux lors du développement de ce système de lyse est l'extraction de composés intracellulaires pour en faire l'analyse ultérieure, notamment lors de l'extraction de l'ADN de bactéries. L'élévation de température constatée pourrait être exploitée pour effectuer l'analyse in situ par amplification isotherme. La faisabilité d'une analyse par amplification LAMP a ensuite été testée.

2.1. Etude thermique

2.1.1. Dispositif expérimental

Deux mesures de températures sont effectuées simultanément : une mesure à la surface de la cuve en COC en U à l'aide d'une caméra thermique et une mesure de la température du liquide à l'intérieur de la cuve à l'aide d'un thermocouple.

La mesure de température à la surface de la cuve est effectuée à l'aide d'une caméra thermique FlirSystems Thermovision A20 équipée d'un objectif infrarouge 9,2 mm. Les images sont acquises et traitées sur un ordinateur. La cuve est placée à 10 cm de l'objectif. Pour l'analyse des images, l'émissivité retenue pour le COC est $\gamma = 0,970$. Une image est acquise toutes les 5 secondes pendant la durée du film.

La température du liquide à l'intérieur de la cuve est mesurée avec un thermocouple de type K. La sonde du thermocouple est insérée dans la cuve à 1,5 cm du foyer des électrodes. Le thermocouple est relié à la terre par sécurité tout comme l'appareil de mesure, enveloppé dans du papier d'aluminium. Les valeurs de températures affichées sont relevées à intervalles de temps régulier.

2.1.2. Paramètres influençant l'échauffement

2.1.2.1. Ecartement des pointes des électrodes

Différents écartements ont alors été testés dans des cuves neuves. Le graphique ci-dessous donne la température maximale mesurée en fonction de l'écartement des pointes des électrodes :

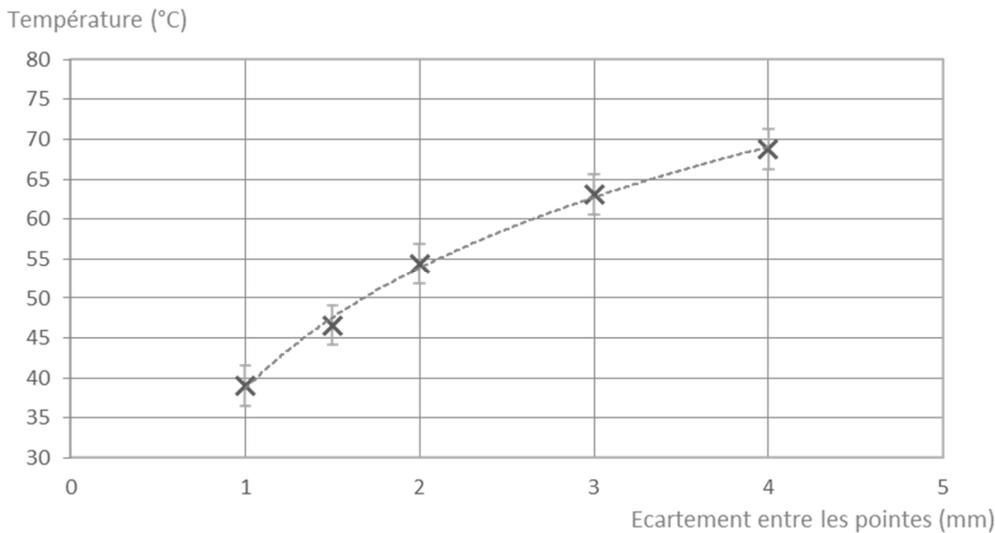


Figure 100 : Température maximale relevée dans des cuves neuves à la fin d'une séquence de 200 décharges, en fonction de l'écartement entre les pointes des électrodes.

Les mesures de températures effectuées dans ces différentes configurations suggèrent une relation logarithmique entre l'écartement entre les pointes des électrodes et la température maximale atteinte au terme d'une série de 200 décharges. Ces valeurs de températures restent inférieures à 70°C à 1,5 cm du foyer des électrodes dans des cuves neuves.

Or, rappelons que dans le chapitre 3 une température proche de 80°C avait été mesurée. L'écartement des électrodes est donc une contribution importante mais non exclusive à l'augmentation de température lors du vieillissement de la cuve.

2.1.2.2. Vieillissement des pointes

Les mesures précédentes ont été répétées à la suite d'une exposition des cuves neuves à 2000 décharges supplémentaires (cuves à l'état « usée »). Les courbes obtenues sont présentées dans les graphiques en Figure 101.

Les graphiques obtenus mettent en évidence une augmentation de la température maximale atteinte après usure des électrodes. Cette évolution est d'environ 20°C lorsque la cuve est usée par 2000 décharges.

L'augmentation de l'écartement entre les pointes des électrodes et l'augmentation du rayon de courbure des pointes, mentionnée dans la section 1.4, contribuent donc chacune à l'élévation de la température maximale mesurée.

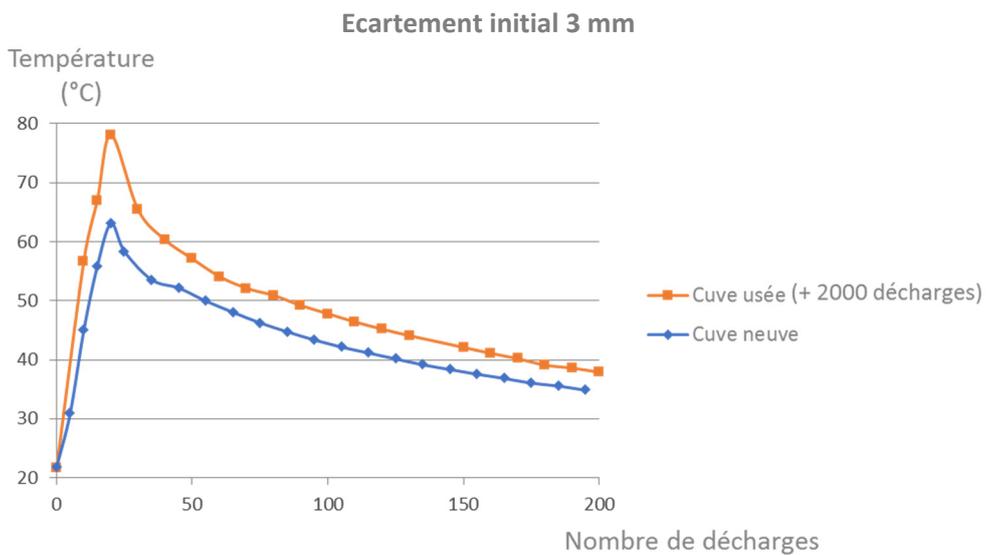
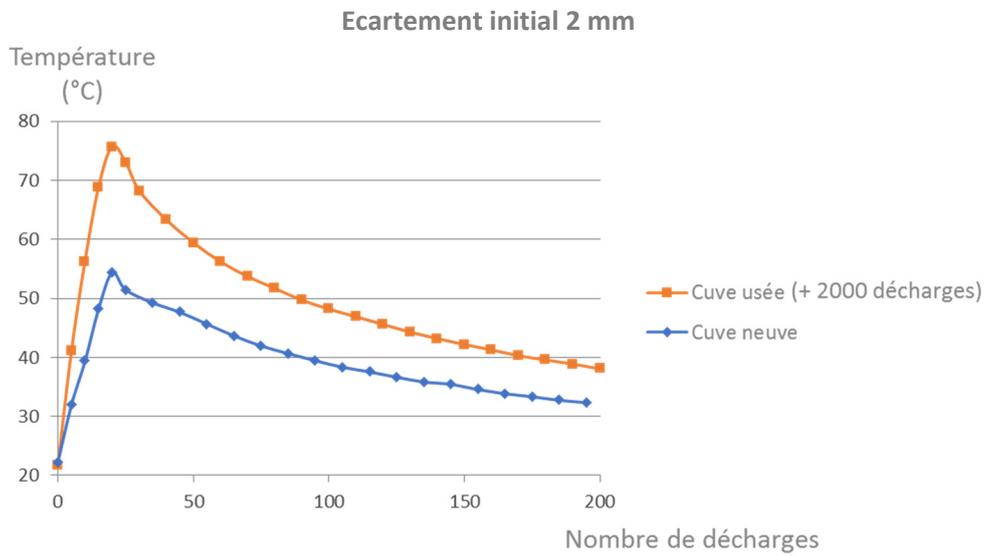
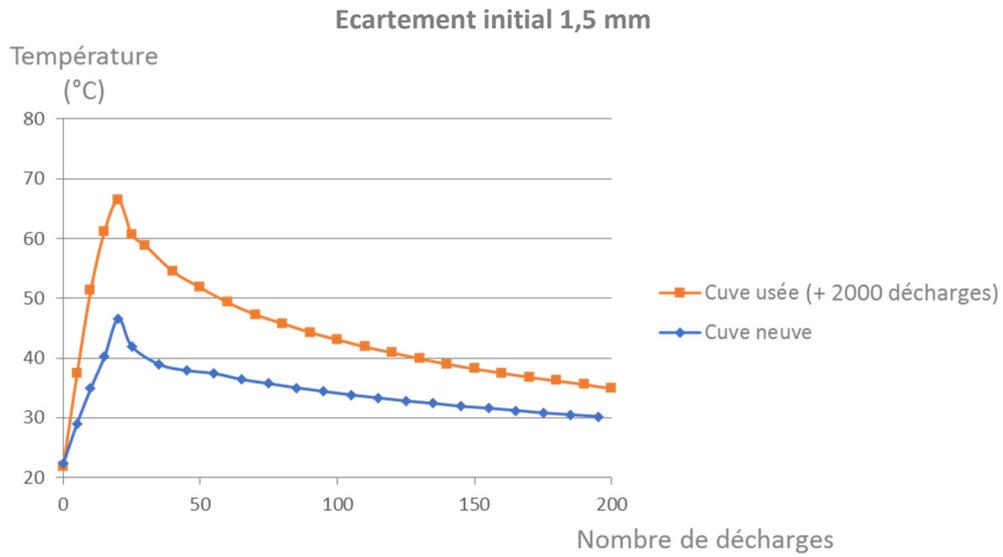


Figure 101 : Température mesurée à l'intérieur de cuves en U après 200 décharges. La cuve dite "usée" a subi environ 2000 décharges au préalable.

2.2. Faisabilité d'une détection *in situ*

2.2.1. Rappels sur l'amplification isotherme

L'amplification isotherme est une technique d'amplification d'une séquence spécifique d'ADN à température constante. Elle offre des possibilités d'analyse moins coûteuses et plus rapides que la PCR quantitative qui repose sur des cycles de température. Pour la LAMP (« Loop-mediated isothermal AMPLification ») la température de l'échantillon doit être maintenue entre 60°C et 65°C a minima pendant 30 minutes (Nagamine et col., 2002). Le résultat de la LAMP peut être suivi par simple mesure du pH. En effet sous l'action de la polymérase, lors de la fixation d'un désoxyribonucléotide sur l'ADN en formation, un proton est libéré. Lorsque l'amplification d'un brin d'ADN a été effectuée un certain nombre de fois, le pH de la solution est donc abaissé significativement. Ce changement de pH peut être suivi à l'aide d'un indicateur coloré ; dans notre protocole il s'agit du rouge de Crésol dont la zone de virage est située entre pH 7,2 et 8,8 (Tanner et col., 2015).

Dans ce paragraphe, la possibilité de maintenir une température constante à l'intérieur de la cuve à l'aide des décharges haute tension sera présentée. Un échantillon contenant le mélange réactionnel a également été soumis aux décharges haute tension afin de tester la résistance des réactifs aux décharges.

2.2.2. Applications

2.2.2.1. Exploitation d'un plateau de température

Dans un premier temps, une température proche de 55 °C a été recherchée dans la cuve en répétant régulièrement des séquences de décharges haute. Le graphique présenté en Figure 102 a été obtenu appliquant une séquence de 200 décharges à 10 Hz puis en répétant des séquences de 10 décharges toutes les 10 secondes. Ces mesures ont été effectuées dans une cuve en U usée dont l'écartement initial entre les électrodes a été mesuré à 4,2 mm.

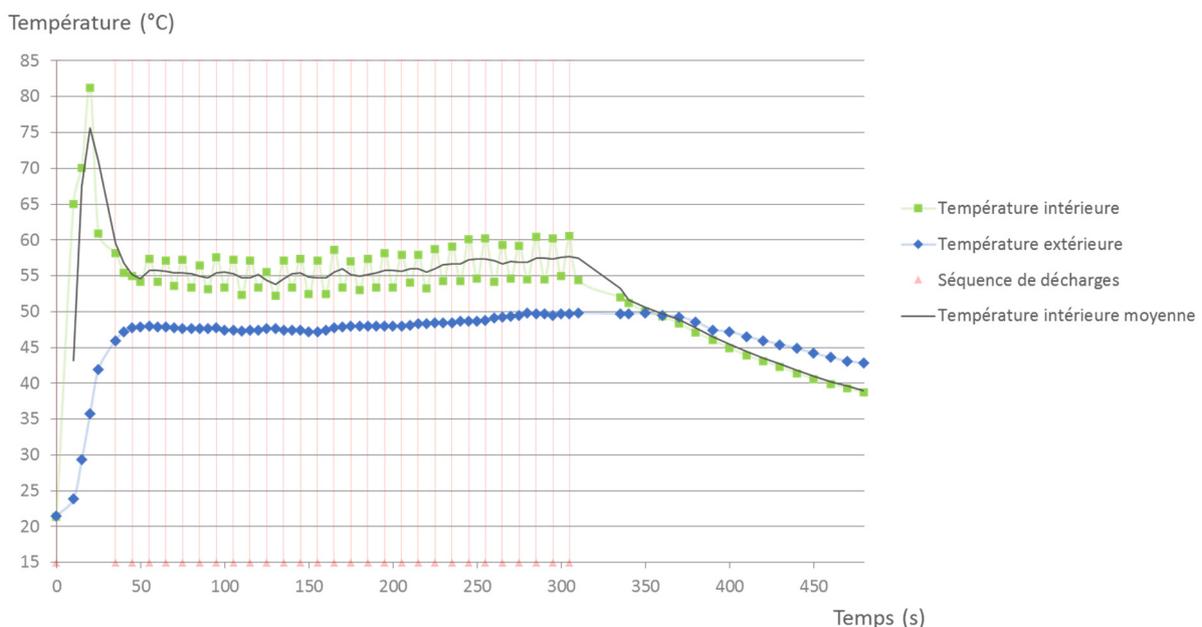


Figure 102 : Température mesurée à l'intérieur et à l'extérieur de la cuve après plusieurs séquences de décharges. Les décharges sont répétées à 10 Hz, la première séquence compte 200 décharges et les suivantes 10.

Cette séquence de décharges haute tension a permis de maintenir la température du liquide dans la cuve entre 52°C et 60°C pendant plus de 270 secondes. Cependant remarquons que la température moyenne à l'intérieur de la cuve ainsi que la température de la cuve, mesurée par la caméra thermique, augmente significativement à partir de la 18^{ème} séquence de 10 décharges (correspondant approximativement à $t = 200$ s). Cette élévation de la température est *a priori* liée à la dégradation des pointes des électrodes au cours des décharges.

Pour prolonger la constance de la température, plusieurs solutions éventuellement complémentaires peuvent être envisagées :

- utiliser un matériau plus résistant pour fabriquer les électrodes,
- espacer les séquences de décharges au cours du temps. Les séquences peuvent également être déclenchées par un dispositif électronique mesurant la température,
- isoler thermiquement la cuve.

2.2.2.2. Résistance des réactifs

Le mélange réactionnel contenant notamment la polymérase, les nucléotides, un tensio-actif, du sulfate d'ammonium et l'indicateur colorimétrique de pH (rouge de Crésol), a été introduit dans la cuve puis soumis à une séquence de 200 décharges haute tension. Les décharges ne modifiant pas significativement le pH de la solution, la solution ne contenant pas de primer la solution devrait garder sa couleur initiale. L'expérience montre cependant le contraire (cf. Figure 103).

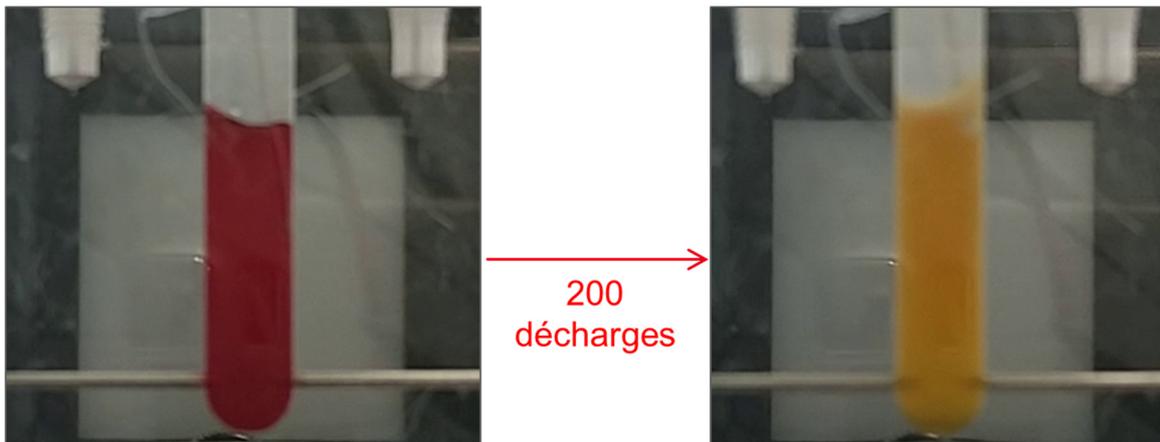


Figure 103 : Changement de couleur de la solution après une séquence de 200 décharges.

Ce résultat montre que l'application des décharges haute tension induit des perturbations chimiques dans le mélange réactionnel. Une première solution consisterait donc à chercher des réactifs plus robustes qui pourraient être utilisés en présence de l'arc électrique.

Conclusion

Dans ce chapitre, des perspectives d'évolution ont été présentées afin de s'approcher d'une application concrète de la technique de lyse étudiée. Ces évolutions sont de deux natures : permettre au dispositif de fonctionner en continu dans le cadre d'une bioproduction (cf. section 1) et effectuer l'analyse in situ (cf. section 2). Ces évolutions ont pu obtenir certaines preuves de concept :

- le fonctionnement d'une vanne fondée sur les effets capillaires pour retenir un liquide en surpression dans une cuve a pu être montré,
- la possibilité d'effectuer une analyse nécessitant une élévation et/ou un maintien de température a été observée.

Cependant ces preuves de concept constituent simplement des ébauches de systèmes fonctionnels. L'étude doit être poursuivie afin d'espérer obtenir les dispositifs imaginés. Ainsi il convient de résoudre plus précisément les problèmes suivants :

Pour la bioproduction :

- la vanne capillaire doit gagner en fiabilité. Il est nécessaire de comprendre l'origine de son dysfonctionnement après une centaine de décharges. Nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : à chaque jet un petit volume de liquide « tombe » sur la surface du cône. Celle-ci finit par être suffisamment mouillée pour abaisser significativement l'angle d'avancé de la goutte située à l'orifice de sortie. Le développement d'une solution permettant la collecte de l'intégralité du liquide éjecté pourrait faire l'objet d'une prochaine étude.
- la lyse de microorganismes (en particulier des microalgues) doit être vérifiée dans une telle cuve.

Pour l'analyse :

- la dégradation des réactifs permettant la détection des éléments recherchés dans la solution à analyser doit être évitée. Il convient donc par exemple de rechercher d'autres réactifs plus robustes pour effectuer une amplification isotherme,
- le maintien de la température dans la cuve pourrait être affiné par des séquences de décharges mieux adaptées et une isolation calorifique de la cuve. Une étude thermique plus poussée serait alors nécessaire.

Même s'il ne propose pas encore un système fonctionnel, ce chapitre a néanmoins permis d'entrevoir la possibilité d'exploiter les effets de la décharge haute tension pour obtenir des fonctions supplémentaires.

Conclusion générale

L'objet du travail de thèse présenté dans ce mémoire était l'étude d'une nouvelle technique de lyse fondée sur des décharges électriques en milieu aqueux mettant en œuvre de nombreux phénomènes physico-chimiques. Au terme de ce travail furent apportées les preuves de concept nécessaires au développement d'un tel système de lyse cellulaire.

Dans les chapitres 2 et 3 les phénomènes physiques mis en jeu ont été énumérés et décrits afin de comprendre l'origine de la lyse ; ces parties permirent de conclure que :

- dans l'eau courante, d'une conductivité de 50 mS/m, une décharge haute tension de 10 kV entre deux électrodes en pointe à partir d'un générateur délivrant une énergie d'environ 1 J entraîne la formation puis le collapse brutal d'une bulle de gaz. Ces phénomènes s'accompagnent de la production d'ondes de choc.
- dans un milieu confiné la formation d'un arc électrique lors de la décharge produit également d'autres phénomènes physiques. Leur étude a permis de les inclure ou les exclure de la liste des acteurs potentiels de la lyse ; au terme de cette étude seuls trois phénomènes sont retenus : les ondes de choc, les composés chimiques produits et l'élévation de température du milieu.

L'efficacité du traitement par des décharges haute tension a ensuite été évaluée sur deux types de microorganismes, représentant deux domaines applicatifs distincts : des microalgues marines, représentées dans cette étude par les souches *Phaeodactylum tricornutum* et *Nannochloropsis gaditana*, avec un objectif de bioproduction (chapitre 4), et des bactéries, représentées par les souches *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, avec un objectif d'analyse intra-cellulaire (chapitre 5). Dans les deux cas la technique s'est montrée efficace et son mode d'action a été identifié comme résultant principalement des ondes de choc produites.

Le travail effectué avec les microalgues est une première étape vers le développement d'un système capable de libérer et récupérer les lipides. En effet, d'après les résultats obtenus, la technique de lyse en cours d'élaboration est bien efficace avec les microalgues puisque la chlorophylle a pu être libérée à hauteur de 30% de la quantité totale produite. Cependant les lipides extraits ont été quantifiés dans des proportions bien plus faibles et avec une très mauvaise reproductibilité : dans le meilleur des cas, environ 8% de la quantité attendue de lipides a été détectée. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que nous n'avons pas réussi à sélectionner et à utiliser un solvant adapté à l'extraction des lipides. En conséquence peu de lipides ont été détecté dans le surnageant ; ils peuvent avoir été retenus dans la matrice cellulaire avec les débris (Halim et col., 2012), ou bien avoir formé une fine couche lipidique située en surface du tube ou sur ses parois. Dans tous les cas, l'étude doit être poursuivie afin d'extraire en plus grande quantité les lipides de l'échantillon après traitement par les décharges haute tension.

Concernant l'analyse cellulaire, nous avons montré qu'il est possible d'utiliser des décharges haute tension pour ouvrir des bactéries avec un rendement de l'ordre de 60%. Au cours de cette étude, des résultats ont également confirmé l'efficacité préalablement connue des décharges en tant que technique de désinfection, les bactéries ne pouvant plus être cultivées après traitement (taux de survie proche de 0% dans un petit volume traité par 100 décharges). Pour l'analyse de l'ADN par amplification (PCR quantitative, amplification isotherme...), deux techniques ont d'ores et déjà été identifiées pour limiter les pertes de matériel génétique : ajouter une protéine telle que la BSA dans l'échantillon ou employer un matériau adéquat pour fabriquer la cuve. Ces deux solutions ont permis de réduire de plus de 40% les pertes d'ADN lors de l'extraction par des séquences de décharges haute tension.

Conclusion générale

La validation du fonctionnement du dispositif de lyse ayant pu être obtenue, l'objectif de se rapprocher d'un système applicatif fut abordé dans la dernière partie de ce travail de thèse. Pour cela deux axes d'étude ont été engagés :

- L'exploitation de phénomènes hydrauliques pour faire circuler le milieu contenant les microorganismes à lyser, dans le cadre de la bioproduction,
- L'utilisation de la chaleur produite par les décharges haute tension afin de réaliser l'identification in situ de l'ADN présent dans l'échantillon, dans le cadre de l'analyse cellulaire.

Ainsi un système de « pompage » de l'échantillon fondé sur le principe de la vanne capillaire a pu être mis au point. Une étude thermique a également permis de valider le concept d'une amplification isotherme au sein du dispositif de lyse à partir des seuls arcs électriques. La détection de l'ADN n'a cependant pas pu être menée à bien lors de nos expériences suite à la dégradation des réactifs ; l'étude devrait être poursuivie afin de trouver un protocole adapté. Dans ce dernier chapitre, nous avons également mis en évidence l'usure des électrodes au cours des séquences de décharges. Selon l'application visée, il pourra être nécessaire de limiter cette usure en utilisant un matériau plus résistant comme par exemple le titane.

Il va de soi que l'étude entreprise ici doit être complétée par un bilan économique global. A titre d'exemple, lors des expériences avec des microalgues cultivées dans l'eau de mer, les échantillons ont été dessalés. Cette opération entraîne une consommation significative d'énergie qui n'a pas été évaluée. Une autre solution aurait pu être d'augmenter la puissance du générateur afin de permettre le claquage dans l'eau salée (Broyer, 1995). De la même manière d'autres étapes pourraient être rendues plus économiques en cherchant des solutions alternatives. Dans cette perspective il est important de comparer la consommation électrique globale avec celle des autres techniques de lyse (chauffage, broyage, ultrasons, etc). Des travaux préliminaires effectués pendant cette thèse permettent d'envisager un gain de l'ordre de 1/3 par rapport à la lyse par ultrasons. Ce gain doit être vérifié et confirmé.

Comme expliqué précédemment, l'étude concernant la récupération des lipides doit être poursuivie en priorité, peut-être en portant une attention plus particulière aux propriétés chimiques des éléments mis en jeu (débris cellulaires, matériaux de la cuve de traitement, ajout d'un solvant). En outre, les représentants choisis des microalgues ne sont pas forcément les plus adaptés ; ainsi la technique pourrait par exemple être plus efficace avec des souches cultivées de façon à être recouvertes de silice et les membranes seraient alors sans doute plus sensibles aux ondes de choc produites. Il est important de noter que les espèces de microalgues utilisées ici ont été choisies car elles sont communes dans les laboratoires, mais un travail ultérieur peut consister à s'intéresser davantage au choix de l'espèce et des conditions de culture de la souche les plus judicieuses pour cette technique de lyse.

Concernant l'analyse des composés extraits, les travaux doivent être poursuivis pour adapter le dispositif au composé recherché (ADN, protéines, glucides...). L'analyse de protéines, à l'aide d'anticorps par exemple, après traitement des cellules par décharges haute tension, pourrait faire l'objet d'une étude postérieure.

Enfin un dernier point intéressant serait de coupler désinfection et ouverture, à savoir utiliser les décharges haute tension pour désinfecter une solution de microalgues. On sait qu'aujourd'hui (Kazamia et col., 2012) un grand problème dans le développement des cultures de microalgues est la contamination des souches. Le procédé proposé dans ce mémoire, permettant à la fois de tuer les bactéries avec peu de décharges (chapitre 5) puis de libérer le contenu des microalgues (chapitre 4) pourrait apporter une solution aux problèmes de contaminations qui freinent à l'heure actuelle les grands groupes à poursuivre leurs travaux vers la production de biocarburants algaux.

Conclusion générale

Annexe 1 : Liste des contributions scientifiques

Brevet :

Titre : Système et procédé pour lyser un échantillon biologique

Inventeurs : Hadrien Lamotte, Jean-Luc Achard, Jean-Maxime Roux

Dates : Déposé le 20 juin 2016 en France sous la référence 1655703 puis étendu à l'Union Européenne en juin 2017 sous la référence ICG40012.

Posters :

Titre du poster : A new shockwaves based technique for cell lysis

Auteurs : Hadrien Lamotte, Jean-Maxime Roux, Josselin Lupette, Éric Maréchal, Jean-Luc Achard

Conférence : GDR Micro et Nanofluidique à l'Institut Pierre-Gilles de Gennes (Paris, France)

Dates : 23 et 24 juin 2016

Titre : Extraction by spark generated shockwaves

Auteurs : Hadrien Lamotte, Jean-Maxime Roux, Josselin Lupette, Éric Maréchal, Jean-Luc Achard

Conférence : AlgaEurope Conference (Madrid, Espagne)

Dates : 13 au 15 décembre 2016

Article :

Titre : An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework

Auteurs : Jean-Maxime Roux, Hadrien Lamotte, Jean-Luc Achard

Conférence : Sustainable Solutions for Energy and Environment (EENVIRO) (Bucharest, Roumanie)

Dates : 26 au 28 octobre 2016

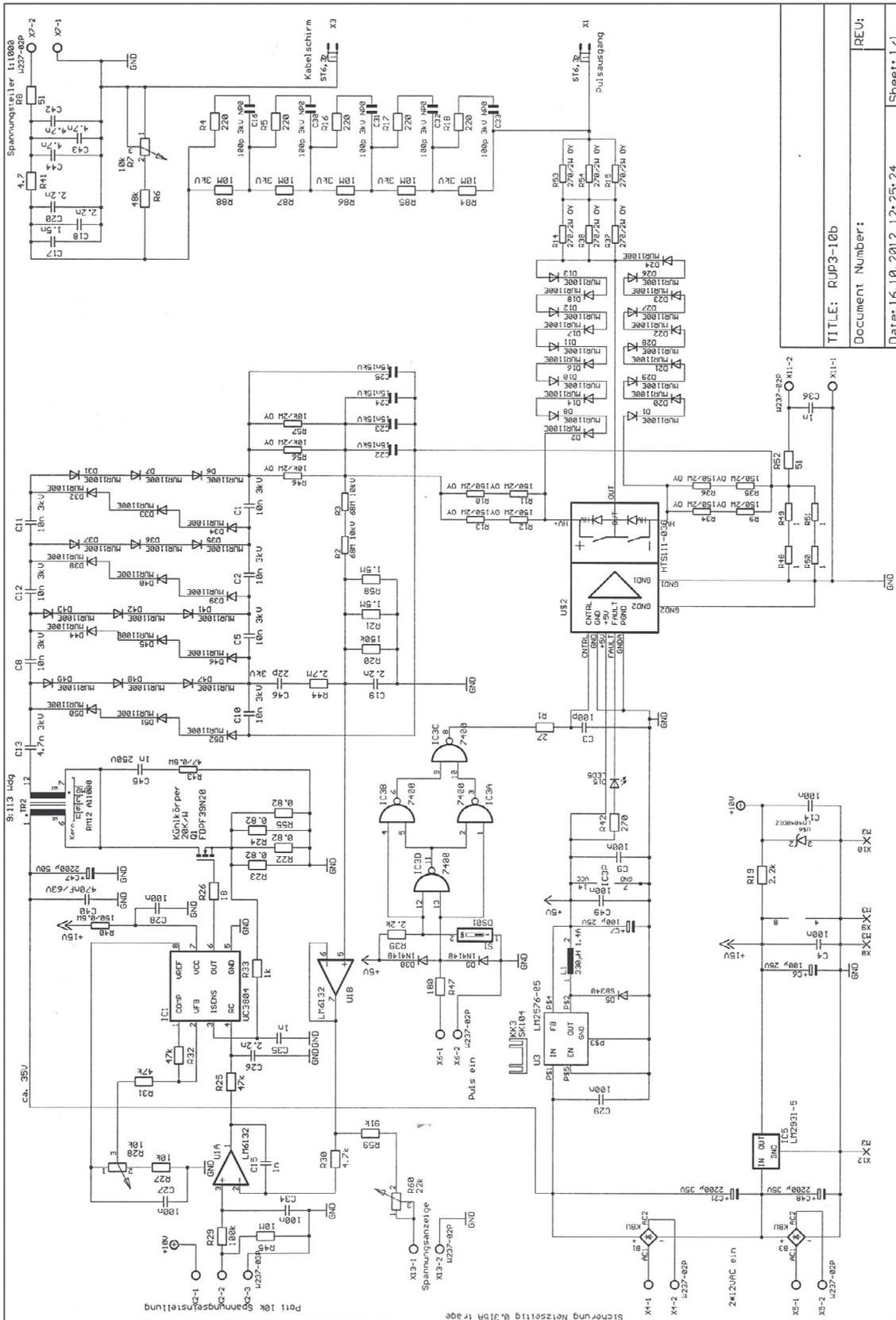
Interne au CEA :

Rédaction et diffusion d'un fait marquant pour la direction du CEA-Grenoble :

Titre : Ouverture de micro-organismes (lyse) à l'aide de décharges électriques haute tension

Émetteur : Hadrien Lamotte

Annexe 2 : Schéma électrique complet du générateur haute tension



TITLE: RUP3-10b
 Document Number:
 Date: 16.10.2012 12:25:24
 Sheet: 1/1

Bibliographie

- Aitken, F., McCluskey, F. M. J., Denat, A. (1996). An energy model for artificially generated bubbles in liquids. *Journal of Fluid Mechanics*, **327**, 373-392.
- Bahadar, A., Bilal Khan, M. (2013). Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27**, 128–148.
- Bao, N., Le, T. T., Cheng, J-X., Lu, C. (2010). Microfluidic electroporation of tumor and blood cells: observation of nucleus expansion and implications on selective analysis and purging of circulating tumor cells. *Integrative Biology*, **2**(2–3), 113–120.
- Bazhal, M. I., Lebovka, N. I., Vorobiev, E. (2001). Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction. *Journal of Food Engineering*, **50**(3), 129–139.
- Bergles, A. E., Collier, J. G., Delhay, J. M., Hewitt, G. F., Mayinger, F. (1981). *Two-Phase Flow and Heat Transfer in the Power and Process Industries*. Hemisphere Publishing Corporation, New York.
- Bird, R. B., Stewart, W. E., Lightfoot, E. N. (2002). *Transport Phenomena, 2nd edition*. John Wiley & Sons, New Jersey (États-Unis).
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**(6), 1513–1523.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8), 911–917.
- Boussetta, N. (2010). Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de champagne. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne.
- Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014). Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*, **17**, 197-203.
- Brennen, C. (2013). *Cavitation and bubble dynamics*. Oxford University Press, New York (États-Unis).
- Brown, R. B., Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, **5**, 131-138.
- Broyer, P. (1995). Générateur électrohydraulique d'ondes de choc utilisant une ligne de transmission. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon.
- Buogo, S., Cannelli, G. B. (2002). Implosion of an underwater spark-generated bubble and acoustic energy evaluation using the Rayleigh model. *Journal of the Acoustical Society of America*, **111**(6).
- Byreddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., Puri, M. (2015). Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from thraustochytrid strains. *Marine Drugs*, **13**(8), 5111–5127.
- Canselier, J. P., Delmas, H., Wilhelm, A. M., Abismail, B. (2002). Ultrasound Emulsification - An Overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **23**, 333–349.
- Carreto, J. I., Catoggio, J. A. (1976). Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth. *Marine Biology*, **36**(2), 105–112.
- Ceccato, P. H. (2010). Filamentary plasma discharge inside water: initiation and propagation of plasma in a dense medium. Thèse de Doctorat, École polytechnique, Palaiseau.
- Chen, C., Smye, S. W., Robinson, M. P., Evans, J. A. (2006). Membrane electroporation theories : A review. *Medical and Biological Engineering and Computing*, **44**, 5–14.

Bibliographie

- Cheng, C-H., Du, T-B., Pi, H-C., Jang, S-M., Lin, Y-H., Lee, H-T. (2011). Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresource Technology*, **102**(21), 10151–10153.
- Chiantia, S., Ries, J., Schwille, P. (2009). Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1788**(1), 225–233.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3), 294–306.
- Cho, Y. I., Fridman, A. A. (2012). Application of Pulse Spark Discharges for Scale Prevention and Continuous Filtration Methods in Coal-Fired Power Plant. Rapport technique, Drexel University, Philadelphia (États-Unis).
- D'Ippolito, G., Sardo, A., Paris, D., Vella, F. M., Adelfi, M. G., Botte, P., Gallo, C., Fontana, A. (2015). Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, **8**(1), 28.
- Dang, T. H. (2011). Etude des Décharges Electriques dans l'Eau et Application à l'Élimination de Polluants et Optimisation du Rendement Énergétique. Thèse de Doctorat, Institut Polytechnique de Grenoble.
- De Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, **43**(5), 992–1009.
- Delrue, F., Álvarez-Díaz, P. D., Fon-Sing, S., Fleury, G., Sassi, J. F. (2016). The environmental biorefinery: Using microalgae to remediate wastewater, a win-win paradigm. *Energies*, **9**(3).
- Dong, T., Knoshaug, E. P., Pienkos, P. T., & Laurens, L. M. L. (2016). Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, **177**, 879–895.
- Dors, M. (2011). Plasma Water Treatment. Cours à l'école d'été PlasTEP, Warszawa (Pologne).
- Dussan, E. B. (1979). On the Spreading of Liquids on Solid Surfaces: Static and Dynamic Contact Lines. *Annual Review of Fluid Mechanics*, **11**, 371–400.
- Franc, J-P. (2006). Physics and Control of Cavitation. Design and Analysis of High Speed Pumps, Rapport du Science and Technology Organization (NATO).
- Glière, A., Delattre, C. (2006). Modeling and fabrication of capillary stop valves for planar microfluidic systems. *Sensors and Actuators A: Physical*, **130**, 601–608.
- Grahl, T., Märkl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 148–157.
- Greenly, J. M., Tester, J. W. (2015). Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. *Bioresource Technology*, **184**, 276–279.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, **33**, 243–260.
- Gupta, S. B., Bluhm, H. (2008). The Potential of Pulsed Underwater Streamer Discharges as a Disinfection Technique. *IEEE Transactions on Plasma Science*, **36**, 1621–1632.
- Gurtovenko, A. A., Anwar, J. (2007). Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *Journal of Physical Chemistry B*, **111**(35), 10453–10460.
- Halim, R., Danquah, M. K., Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, **30**(3), 709–732.

- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, **102**(1), 178–185.
- Han, F., Wang, Y., Sims, C. E., Bachman, M., Chang, R., Li, G. P., Allbritton, N. L. (2003). Fast electrical lysis of cells for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **75**(15), 3688–3696.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, **1**(5), 763–784.
- Harun, R., Jason, W. S. Y., Cherrington, T., Danquah, M. K. (2011). Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy*, **88**(10), 3464–3467.
- Haute Autorité de Sureté. (2011). Médecine esthétique, attention aux techniques de lyse adipocytaire. Rapport publique de la Haute Autorité de Sureté (France).
- Heid, C., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**(10), 986–994.
- Held, P., Raymond, K. (2011). Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red. Note applicative de BioTek Instruments (États-Unis).
- Hibberd, D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **82**(2), 93–119.
- Ho, S. Y., & Mittal, G. S. (1996). Electroporation of Cell Membranes: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **16**(4), 349–362.
- Hoffer, I. P. (2014). Shock waves generated by corona - like discharges in water. Thèse de Doctorat, Czech Technical University, Praha (République tchèque).
- Joshi, A. A., Locke, B. R., Arce, P., Finney, W. C. (1995). Formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and aqueous electrons by pulsed streamer corona discharge in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, **41**(1), 3–30.
- Jubeau, S., Marchal, L., Pruvost, J., Jaouen, P., Legrand, J., Fleurence, J. (2013). High pressure disruption: A two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*, **25**(4), 983–989.
- Kieffer, S. W. (1977). Sound Speed in Liquid-Gas Mixtures: Water-Air and Water-Steam. *Journal of Geophysical Research*, **82**(20), 2895-2904.
- Kim, J., Johnson, M., Hill, P., Gale, B. K. (2009). Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification. *Integrative Biology*, **1**(10), 574–86.
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., Park M. S., Yang, J. W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **31**(6), 862–876.
- Lai, H.-H., Quinto-Su, P. A., Sims, C. E., Bachman, M., Li, G. P., Venugopalan, V., Allbritton, N. L. (2008). Characterization and use of laser-based lysis for cell analysis on-chip. *Journal of The Royal Society Interface*, **5**, 113–121.
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J-P., Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology*, **43**(17), 6475–6481.
- Lee, S-G., Chung, K-J., Hwang, Y. S. (2015). Correlation of the peak pressure generated by an underwater spark discharge with energy absorption in a spark channel. *Journal of the Korean Physical Society*, **66**(12), 1845–1851.

Bibliographie

- Lei, K., Li, N., Huang, H., Huang, J., Qu, J. (2011). The characteristics of underwater plasma discharge channel and its discharge circuit. *Advanced Electrical and Electronics Engineering*, **87**, 619–626.
- Li, N., Huang, J. G., Lei, K. Z., Chen, J. F., Zhang, Q. F. (2011). The characteristic of the bubble generated by underwater high-voltage discharge. *Journal of Electrostatics*, **69**(4), 291–295.
- Ling, G., Bandak, F., Armonda, R., Grant, G., Ecklund, J. (2009). Explosive Blast Neurotrauma. *Journal of Neurotrauma*, **26**(6), 815–825.
- Locke, B. R., Sato, M., Sunka, P., Hoffmann, M. R., Chang, J. S. (2006). Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **45**(3), 882–905.
- Lodish, H. F., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & James, D. (1999). *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman, New York (États-Unis).
- Lubián, L., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I. E., Sobrino, C., González-del Valle, M., Pares, G. (2000). Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, **12**, 249–255.
- Lundquist, T. J., Woertz, I. C., Quinn, N. W. T., Benemann, J. R. (2010). A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. Rapport du Energy Biosciences Institute, California (États-Unis).
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, **140**, 315–322.
- Man, Y., Lv, X., Iqbal, J., Jia, F., Xiao, P., Hasan, M., Li, Q., Dai, R., Geng, L., Qing, H., Deng, Y. (2013). Adsorptive BSA coating method for CE to separate basic proteins. *Chromatographia*, **76**, 59–65.
- Marentis, T. C., Kusler, B., Yaralioglu, G. G., Liu, S., Haeggström, E. O., Khuri-Yakub, B. T. (2005). Microfluidic sonicator for real-time disruption of eukaryotic cells and bacterial spores for DNA analysis. *Ultrasound in Medicine & Biology*, **31**(9), 1265–1277.
- Markou, G., Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, **31**(8), 1532–1542.
- Mercer, P., Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**(5), 539–547.
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **58**, 180–197.
- Muhammad Arif, M., Abdul, G., Salman Akbar, M. (2001). Water purification by electrical discharges. *Plasma Sources Science and Technology*, **10**(1), 82.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, **16**, 223–229.
- Nan, L., Jiang, Z., Wei, X. (2014). Emerging microfluidic devices for cell lysis: a review. *Lab on a Chip*, **14**(6), 1060–73.
- Obreschkow, D., Dorsaz, N. (2011). Confined shocks inside isolated liquid volumes: A new path of erosion? *Physics of Fluids*, **23**.
- Owens, T. G., Wold, E. R. (1986). Light-Harvesting Function in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Isolation and Characterization of Pigment-Protein Complexes. *Plant Physiology*, **80**(3), 732–738.

- Patil, P. D., Gude, V. G., Mannarswamy, A., Deng, S., Cooke, P., Munson-McGee, S., Rhodes, I., Lammers, P., Nirmalakhandan, N. (2011). Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. *Bioresource Technology*, **102**(1), 118–122.
- Pinchuk, M., Kolikov, V. (2012). Shock waves in water at low energy pulsed electric discharges. *Journal of Physics: Conference Series*, **406**.
- Poitras, E., Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, **2**(2), 2–11.
- Rakesh, S., Dhar, D. W., Prasanna, R., Saxena, A. K., Saha, S., Shukla, M., Sharma, K. (2015). Cell disruption methods for improving lipid extraction efficiency in unicellular microalgae. *Engineering in Life Sciences*, **15**(4), 443–447.
- Ramluckan, K., Moodley, K. G., Bux, F. (2014). An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, **116**, 103–108.
- Rashid, N., Ur Rehman, M. S., Sadiq, M., Mahmood, T., Han, J. I. (2014). Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **40**, 760–778.
- Rassweiler, J. J., Knoll, T., Köhrmann, K-U., McAteer, J. A., Lingeman, J. E., Cleveland, R. O., Bailey, M.R., Chaussy, C. (2011). Shock wave technology and application: an update. *European Urology*, **59**(5), 784–796.
- Rau, K. R., Quinto-Su, P. A., Hellman, A. N., Venugopalan, V. (2006). Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: time-resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects. *Biophysical Journal*, **91**(1), 317–329.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, **103**, 444–467.
- Ridley, C. (2016). Can we save the algae biofuel industry? Article issu de The Conversation (www.theconversation.com).
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J-P., Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, **8**, 42.
- Sato, M., Ohgiyama, T., Clements, J. S. (1996). Formation of Chemical Species and Their Effects on Microorganisms Using a Pulsed High-Voltage Discharge in Water. *IEEE Transactions on Industry Applications*, **32**(1), 106–112.
- Schlichting, H. (1979). *Boundary-Layer Theory*. McGRAW-Hill, New York (États-Unis).
- Serres, M., Farouki, N. (1997). *Dictionnaire des Sciences*. Flammarion, Paris.
- Singh, J., Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(9), 2596–2610.
- Singh, N. K., Dhar, D. W. (2011). Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **31**(4), 605–629.
- Smith, J. O. (2010). *Physical Audio Signal Processing*. W3K Publishing.

Bibliographie

- Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Mirabella, B., Legeret, B., Bouvet, S., Peltier, G., Li-Beisson, Y., Taha, S., Takache, H. (2015). Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresource Technology*, **177**, 224–232.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., Jr., T. C. E. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*, **58**, 59-68.
- Timoshkin, I., Fouracre, R. A., Given, M. J., MacGregor, S. J. (2006). Hydrodynamic modelling of transient cavities in fluids generated by high voltage spark discharges. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **39**, 4808–4817.
- Timoshkin, I., & MacGregor, S. (2008). Plasma-acoustic sources and their practical applications. *17th International Conference on Gas Discharges and Their Applications*, 381–384.
- Tobazeon, R. (1997). Préclaquage et claquage des liquides diélectriques. *Techniques de L'ingénieur, Génie Électrique*, **33**.
- Tomita, Y., Kodama, T., Shima, A. (1991). Secondary cavitation due to interaction with a rising free surface of a collapsing bubble. *Applied Physics Letters*, **59**, 274–276.
- Topare, N. S., Raut, S. J., Renge, V. C., Khedkar, S. V., Chavan, Y. P., Bhagat, S. L. (2011). Extraction of oil from algae by solvent extraction and oil expeller method. *International Journal of Chemical Sciences*, **9**(4), 1746–1750.
- Touya, G. (2005). Contribution à l'étude expérimentale des décharges électriques dans l'eau et des ondes de pression associées. Thèse de Doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.
- Touya, G., Reess, T., Pécastaing, L., Gibert, A., Domens, P. (2006). Development of subsonic electrical discharges in water and measurements of the associated pressure waves. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **39**(24), 5236–5244.
- Van der Worp, H., Van den Akker-Scheek, I., Van Schie, H., Zwerver, J. (2013). ESWT for tendinopathy: Technology and clinical implications. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, **21**(6), 1451–1458.
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. M. (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology*, **135**, 142–149.
- Verollet, R. (2008). A major step towards efficient sample preparation with bead-beating. *BioTechniques*, **44**(6), 832–833.
- Vogel, A., Busch, S., Parlitz, U. (1996). Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water. *Journal of Acoustical Society of America*, **100**, 148–165.
- Vogel, A., Noack, J., Nahen, K., Theisen, D., Busch, S., Parlitz, U., Hammer, D. X., Noojin, B. D., Rockwell, B. A., Birngruber, R. (1999). Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **68**(2), 271–280.
- Vorobiev, E., Lebovka, N. (2011). Enhancing Extraction Processes in the Food Industry.
- Warne, L. K., Jorgenson, R. E., & Lehr, J. M. (2005). Resistance of a water spark., (January 2005).
- Wilhelm, K. J. (1973). Recherche des paramètres physiques caractérisant l'érosion par décharge électrique dans un liquide diélectrique. Thèse de Doctorat, Université Paris VI.
- Williams, P. J. L. B., Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, **3**(5).

- Xu, L., Wim Brilman, D. W. F., Withag, J. A. M., Brem, G., Kersten, S. (2011). Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. *Bioresource Technology*, **102**(8), 5113–5122.
- Yamamoto, K., King, P. M., Wu, X., Mason, T. J., Joyce, E. M. (2015). Effect of ultrasonic frequency and power on the disruption of algal cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, **24**, 165–171.
- Yap, B. H. J., Crawford, S. A., Dumsday, G. J., Scales, P. J., Martin, G. J. O. (2014). A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction. *Algal Research*, **5**(1), 112–120.
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, **135**, 166–174.
- Yoo, G., Park, W. K., Kim, C. W., Choi, Y. E., Yang, J. W. (2012). Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresource Technology*, **123**, 717–722.
- Zeng, X., Danquah, M. K., Chen, X. D., Lu, Y. (2011). Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**(6), 3252–3260.
- Zhang, H., Zeng, R., Chen, D., & Liu, J. (2016). A pivotal role of vacuolar H(+)-ATPase in regulation of lipid production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Scientific Reports*, **6**.
- Zhang, T. Y., Hu, H. Y., Wu, Y. H., Zhuang, L. L., Xu, X. Q., Wang, X. X., & Dao, G. H. (2016). Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **60**, 1602–1614.
- Zhu, L. (2015a). Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **41**, 1376–1384.
- Zhu, L. (2015b). Microalgal culture strategies for biofuel production: A review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **9**(6), 801–814.
- Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., Blazeka, Z. Heath, E. (2013). Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20**(4), 1104–1112.

Résumé en français

Cette thèse est consacrée à l'étude d'une technique innovante de lyse de microorganismes, fondée sur l'utilisation d'impulsions haute tension en milieu aqueux. Cette technique se distingue de l'électroporation qui exploite le champ électrique produit pour dégrader la membrane cellulaire ; dans notre étude les impulsions haute tension permettent la formation d'arcs électriques produisant de multiples phénomènes physico-chimiques qui peuvent entraîner la lyse des microorganismes.

L'efficacité du procédé a été évalué sur les microorganismes suivants : des microalgues productrices d'huile (*Nannochloropsis gaditana* et *Phaeodactylum tricornutum*) et des bactéries couramment utilisées comme modèles de laboratoire (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*). Dans ces travaux, nous avons montré que les ondes de pression produites sont principalement responsables de la lyse.

En fin d'étude, des perspectives sont explorées en vue du développement de systèmes autonomes soit dans le cadre de la bioproduction, soit dans le cadre de l'analyse cellulaire.

Résumé en anglais

This thesis focuses on the study of an innovative technology for microorganisms lysis, based on high voltage pulses generated in an aqueous medium. This technology is different from electroporation which operates thanks to the electric field for damaging cell membranes ; in our study high voltage pulses generate an electric arc leading to various physicochemical phenomena supposed to lyse microorganisms.

The technology efficiency is evaluated with the following microorganisms : some lipid producing microalgae (*Nannochloropsis gaditana* and *Phaeodactylum tricornutum*) and classical laboratory model bacteria (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*). In this work, we found that generated shock waves are mainly responsible of the cells lysis.

At the end, the development of self-functioning devices is investigated either for bioproduction or for cell analysis.