



HAL
open science

Développement d'outils miniaturisés pour la microbiologie haut-débit

David Lalanne Aulet

► **To cite this version:**

David Lalanne Aulet. Développement d'outils miniaturisés pour la microbiologie haut-débit. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0160 . tel-01141758

HAL Id: tel-01141758

<https://theses.hal.science/tel-01141758>

Submitted on 13 Apr 2015

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole Doctorale Sciences Chimiques

Spécialité: Chimie Physique

par David LALANNE-AULET

Développement d'outils
miniaturisés pour la microbiologie
haut-débit

Sous la direction d' Annie COLIN

Soutenance le 17 octobre 2014

Membres du jury:

Pierre GUILLOT

Patricia TAILLANDIER

Jérôme BIBETTE

Pierre NASSOY

Stéphanie DESCROIX

Philippe MARCHAL

Correspondant industriel

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Invité

Remerciements:

En premier lieu, je tiens à remercier Annie Colin, ma directrice de thèse, et Pierre Guillot, mon correspondant industriel, pour avoir suivi et encadré ce travail de thèse au cours des trois dernières années. Vous m'avez tous les deux laissé toute la liberté que je voulais, tout en étant toujours très réactifs et disponibles quand j'avais besoin d'aide pour trouver le bon chemin au milieu de toutes ces bactéries. Si j'ai toujours été motivé pour m'investir dans ce travail et si j'en garde un bon souvenir c'est en grande partie grâce à vous, donc merci à vous deux.

Je souhaite également remercier Paul Deschrijver, directeur du Laboratoire du Futur, et Patrick Maestro, ancien directeur, pour m'avoir accueilli au sein du LOF et pour m'y avoir toujours fait sentir l'intérêt de mes recherches pour eux et pour Solvay.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Plus particulièrement, mes remerciements vont à Patricia Taillandier et Jérôme Bibette pour l'avoir rapporté, à Stéphanie Descroix pour avoir accepté de présider le jury, et enfin à Pierre Nassoy et Philippe Marchal pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

En démarrant cette thèse, mes connaissances microbiologiques se résumaient en une capacité à identifier de la moisissure sur un morceau de fromage et à savoir que la bière est obtenue par fermentation. Je remercie donc vivement Philippe Marchal et Gilles Moreau pour m'avoir appris tout ce qu'il faut savoir pour pouvoir cultiver des microorganismes, pour tous leurs conseils, et pour avoir fait tout cela avec sympathie.

Au sein du LOF, j'ai également eu la chance d'échanger et/ou demander conseil à la majorité des membres du laboratoire. Par soucis de concision et de clarté je ne vais pas lister ici l'ensemble de ces personnes, mais je tiens à réellement remercier toutes les personnes présentes sur le trombinoscope à la date de ma soutenance car je ne me trompe pas trop en disant que vous m'avez tous accordé au moins quelques minutes de votre temps durant ces trois dernières années, que ce soit pour discussions ou conseils techniques, scientifiques, administratifs, etc... Je remercie tout particulièrement Hugues, Jean-Baptiste, Jacques, Steeve, Flavie, Matthieu et Céline S, dont le temps qu'ils m'ont accordé se compte plus en heures qu'en minutes. A cette liste je n'oublie pas d'ajouter les personnes qui ont quitté le laboratoire : Julien Beaumont qui m'a formé à la microfabrication à mon arrivée au LOF, Marta Romano qui m'a permis de prendre la température des bactéries, et

Adalberto Piacentini qui m'a relayé pour compter les bactéries pendant six mois. Ces trois années de thèse n'auraient évidemment pas été aussi agréables sans la bonne ambiance du laboratoire. Merci tout d'abord à Laure pour m'avoir fait découvrir le LOF, m'avoir fait refaire le monde autours de cafés/clopes entre deux manip et avoir ruinée (avec l'aide de Xabi) la belle échoppe atypique le soir de sa soutenance de thèse. Merci à mes colloqs de bureau Jordy, Matthieu, Roman et Guillaume, Bernard, et Virginie et Anaïs pour les discussions professionnelles ou non, les pauses basket, etc. . . mais en conservant toujours une ambiance studieuse grâce aux consciences professionnelles de Jordy et moi-même. Je remercie Cyril et Philippe de m'avoir évité le sentiment de solitude lors des arrivées très matinales au labo et pour leurs envois de masques de photolithographie réguliers. Merci à tous les sportifs du LOF avec qui on a pu gravir le col du Tourmalet à vélo ou encore, plus récemment, réaliser la performance de parcourir 13km en 4h30: Stéphane, Philippe, Matthieu, Julien B, Nadia, Céline G, Tiphaine, Jordy, Simon, Marie, Sarah, Anaïs, Alan, Thomas, Dylan, Fanny, Gaëlle, Bertrand, Nicolas, Julien D, Guillaume D et Alisson. Avec une mention spéciale pour Thomas, Julien B, Simon, JC, Kévin, Nico, Alan, Alex, Céline (la petite et la grande) et Guillaume D pour leur présence plus régulière aux footings, foots ou squashes entre midi et deux. Et comme il n'y a pas que le sport qui permet de se détendre après une journée de boulot, merci à Kévin, Nico, Julien B, Patrick et Hugues pour leur présence quasi-quotidienne au Central. Parmi les personnes listées ici, certaines sont devenues plus que des collègues et se reconnaitrons très certainement, merci à vous, j'espère qu'on aura l'occasion de continuer à passer de bons moments ensemble (courir des ironmen, se luxer des coudes, etc. . .).

Ces remerciements ne pourraient être complets sans une mention de la colocation partagée avec Kévin pendant ces trois ans. Le régime pizza – Fifa quotidien nous a indiscutablement permis de conserver une hygiène de vie irréprochable pour être pleins d'énergie à investir dans nos thèses respectives. J'espère que la fin de cette colocation et de ce régime de champions ne nous empêchera pas de nous épanouir dans nos vies futures.

Je tiens enfin à remercier mes parents et toute ma famille pour m'avoir toujours encouragé et soutenu. Lise, merci pour les voyages et tous les moments qu'on a partagé qui m'ont permis de rester motivé et qui ont rendu plus belles ces trois années de thèse.

Titre: DÉVELOPPEMENT D'OUTILS MINIATURISÉS POUR LA MICROBIOLOGIE
HAUT-DÉBIT

Résumé:

La microbiologie est la science qui s'attache à l'étude des microorganismes et de leurs propriétés. Depuis ses débuts au *XVII^{ème}* siècle, les méthodes développées par les microbiologistes ont permis de révéler un énorme potentiel de connaissances et d'applications. Dans les dernières décennies, les industriels ont vu un intérêt tout particulier dans ce domaine d'étude. Le besoin de prévenir les contaminations en inhibant le développement microbien, ou au contraire la volonté de l'optimiser pour profiter des capacités de transformations chimiques des microorganismes a fait naître une demande croissante de tests microbiologiques. Le faible rendement des méthodes traditionnelles ne permettant pas de satisfaire à cette demande, la recherche de nouvelles méthodes de test focalise les intérêts. Les outils fluidiques miniaturisés ont d'ores et déjà fait preuve de leur potentiel pour ce type d'application, bien que leur validation vis-à-vis des méthodes classiques manque souvent.

Dans ce travail de thèse, nous avons développé des incubateurs miniaturisés et des méthodes de suivi de populations de microorganismes optimisées. L'objectif est d'aborder l'impact de la réduction d'échelle d'incubation sur la croissance par rapport aux dispositifs de culture traditionnel, pour ensuite aboutir à un outil haut-débit pour la caractérisation de biocides.

Mots clés : Miniaturisation, Millifluidique, Microbiologie, Haut-débit, Effet d'échelle, Biocide

Title: MINIATURIZED TOOLS DEVELOPMENT FOR HIGH-THROUGHPUT
MICROBIOLOGY

Abstract:

Microbiology is the part of science linked with the study of microorganisms and their properties. Since its beginnings in the *XVIIth* century, the methods developed by the microbiologists revealed a huge potential of knowledge and applications. In the last decades, industrials realized the interests of this study area.

The need to prevent contaminations by inhibiting microbial development, or on the contrary the will to improve it to enjoy the chemical transformations capacities of the microorganisms gave birth to an increasing demand for microbiological tests. The poor yield of traditional methods does not allow to satisfy this need, and the search for new test methods is thus focalizing interests. Miniaturized fluidic tools have already proven their potential for this kind of applications, and yet, their validation towards traditional methods often lacks.

In this work, we aim at developing miniaturized cultivation techniques and optimized growth analysis methods, to study the scale reduction impact of incubator's size on growth, in order to end up with a high-throughput tool for biocide characterization.

Keywords : Miniaturization, Millifluidics, Microbiology, High-throughput, Scale impact, Biocide

UMR 5258 - Rhodia-Laboratoire du Futur
Solvay - CNRS - Université de Bordeaux
178 Avenue du Docteur Albert Schweitzer
33608 PESSAC

Table des matières

Remerciements	ii
Résumé / Abstract	v
Tables des matières	viii
Liste des Figures	xi
Liste des Tableaux	xvi
1 La microbiologie et ses enjeux industriels	1
1.1 Définition et introduction à la microbiologie	1
1.1.1 La croissance microbologique	2
1.1.2 Les méthodes de culture	3
1.1.2.1 La culture en milieu liquide	4
1.1.2.2 La culture sur milieu solide	7
1.1.3 Le dénombrement de populations	8
1.1.3.1 Le comptage par dilutions successives	9
1.1.3.2 La mesure de densité optique	10
1.1.3.3 Autres méthodes de dénombrement	12
1.2 Les enjeux industriels de la microbiologie	16
1.2.1 L'hygiène industrielle	16
1.2.2 Les bioprocédés	17
1.2.3 Les bioénergies	19
1.3 La miniaturisation pour la microbiologie	20
1.3.1 La pertinence des outils miniaturisés pour la microbiologie	21
1.3.2 Exemples d'applications existantes	22
1.3.2.1 Les puces à ADN	22
1.3.2.2 L'étude de cellules uniques	24
1.3.2.3 Les chemostats miniaturisés	26
1.3.3 Le suivi de croissance haut-débit	27
1.3.3.1 Les systèmes disponibles commercialement	28
1.3.3.2 Les dispositifs validés à l'échelle du laboratoire	33
1.3.3.3 La poursuite de la miniaturisation et ses limites	38
1.4 Motivations et objectifs du travail de thèse	39

2	Techniques de mesures et incubateurs miniatures	43
2.1	Les microorganismes d'étude	43
2.2	Les méthodes de comptage de population en ligne	44
2.2.1	Des techniques intéressantes mais incomplètes	45
2.2.1.1	La diffusion de lumière	45
2.2.1.2	La thermographie-calorimétrie	46
2.2.1.3	La spectrométrie Raman	47
2.2.1.4	Les marqueurs fluorescents	47
2.2.2	La mesure de fluorescence couplée à l'absorbance	49
2.2.3	La microscopie de champ clair	51
2.3	Faire croître des microorganismes en gouttes	55
2.3.1	Brève présentation des outils fluidiques miniaturisés	55
2.3.1.1	La millifluidique	56
2.3.1.2	La microfluidique	58
2.3.2	Mini-incubateurs utilisés pour ce travail de thèse	59
2.3.2.1	Les conditions de croissance	60
2.3.2.2	La mise en place et validation expérimentale	61
3	Les conditions de croissance à travers les échelles	70
3.1	Présentation du chapitre	70
3.2	Introduction	72
3.3	Materials and methods	73
3.3.1	Microorganisms	73
3.3.2	Setups	74
3.4	Experimental observations	77
3.5	Model	82
3.5.1	Model definition	82
3.5.2	Boundary conditions	86
3.6	Results and Discussions	87
3.7	Conclusions	95
3.8	Acknowledgements	96
4	Outil haut-débit pour l'évaluation de biocides	99
4.1	La mesure de population en gouttes	99
4.1.1	Les critères optiques	100
4.1.2	L'accès aux mesures quantitatives	101
4.2	Description du système automatisé	102
4.3	Résultats de suivi de croissance automatisé et gain de temps	104
4.3.1	Courbes de croissances automatisées	104
4.3.2	Évolutions et améliorations possibles	106
4.3.3	Applicabilité de la méthode	107
4.4	Application au criblage de biocides haut-débit	108
4.4.1	Les agents de conservations ou biocides	108
4.4.1.1	Définition et enjeux	108

4.4.1.2	Le test d'efficacité biocide	109
4.4.1.3	Les limites des méthodes classiques	111
4.4.2	Détermination expérimentale de CMI	114
4.4.2.1	Acticide MBS	114
4.4.2.2	Glokill PQ	118
4.4.3	L'accès à des données statistiques	122
Conclusion générale		128
A Model modifications for cylindrical and spherical symmetries		132
B Description du système automatisé		135
B.1	Les éléments du système	135
B.2	Le schéma optique	136
B.3	Le schéma de contrôle	139
B.4	Les séquences de traitement	143
Références bibliographiques		147

Liste des Figures

1.1	Courbe de croissance de microorganismes	3
1.2	Poste de sécurité microbiologique	6
1.3	Cultures sur milieu solide	8
1.4	Méthode de dénombrement de population par dilutions successives et comptage de colonies sur boîte de Pétri.	11
1.5	Méthode de mesure de la densité optique (DO) d'une culture de microorganismes.	12
1.6	Loi de poisson	13
1.7	Principe d'utilisation d'une cellule de comptage de microorganismes.	15
1.8	Schéma de concordance de taille	21
1.9	Schéma de principe du fonctionnement d'une puce à ADN	23
1.10	Schéma de principe du fonctionnement du FACS.	25
1.11	Schéma de principe du fonctionnement de du dispositif développé par <i>Tan et al</i>	25
1.12	Schéma de Balagadde	27
1.13	Système MBEC ^(R) commercialisé par INNOVOTECH	29
1.14	Système ARIS 2X ^(R) commercialisé par la société THERMO SCI- ENTIFIC	31
1.15	Système TEMPO ^(R) commercialisé par la société BIOMERIEUX	31
1.16	Carte d'analyse du système TEMPO ^(R)	32
1.17	Système BACTEC ^(R) commercialisé par la société BECTON DICK- INSON	32
1.18	Analyseur millifluidique à gouttes pour la microbiologie	34
1.19	Résultats obtenus par l'Analyseur millifluidique à gouttes pour la microbiologie. (Reproduit à partir de la référence <i>Baraban et al</i> [1])	34
1.20	Dispositif développé par <i>Cira et al.</i> (Reproduit à partir de la référence <i>Cira et al</i> [2])	35
1.21	Dispositif développé par <i>Takagi et al</i> (en haut), et exemple de résultats obtenus du suivi de développement de biofilms (Reproduit à partir de la référence <i>Takagi et al</i> [3]).	37
1.22	Dispositif microfluidique pour criblage de conditions de culture	37
1.23	Loi de Moore microbiologique proposée par <i>Gefen et al.</i> (Reproduit à partir de la référence <i>Gefen et al</i> [4]).	38
2.1	Résultats de mesures de diffusion statique de lumière par Ecoli à pop= 1e8, 1e9, 1e10 à un angle de mesure de 20°.	46

2.2	Spectres Raman du Glucose	48
2.3	AlamarBlue	48
2.4	Suivi de culture de <i>E. coli</i> par mesure de la fluorescence de l'AlamarBlue, inoculation à 10^7 UFC/mL.	49
2.5	Goutte avec bactéries fluorescentes	49
2.6	Comparaison de croissance erlenmeyer/gouttes	52
2.7	Comptage optique en millifluidique	53
2.8	Écoulement microfluidique	56
2.9	Matériel pour circuits millifluidiques	57
2.10	Matériel pour écoulements millifluidiques	58
2.11	Micro-fabrication PDMS	60
2.12	Génération de gouttes millifluidiques	62
2.13	Génération de gouttes millifluidiques	63
2.14	Stockage de gouttes millifluidiques	63
2.15	Comparaison des courbes de croissance obtenues en erlenmeyer et en gouttes.	64
2.16	Micro-fabrication Dyneon THV	66
2.17	Exemple de réalisation en puces microfluidiques en Dynéon THV	67
3.1	Photographs of the incubators used in this study. Incubator 1/ is a 100 mL Erlenmeyer flask with a porous cap, incubator 2/ is a 9 mL sealed vial, incubator 3/ corresponds to 5 μ L droplets either in permeable or sealed tube and finally, incubator 4/ to 1 μ L droplets in permeable tube.	74
3.2	Description of the symbols, geometries, exchange conditions and sizes associated with each incubator used in this study.	76
3.3	Growth curves of <i>Escherichia coli</i> (Top) and of <i>Staphylococcus aureus</i> (Bottom) for various incubation conditions	77
3.4	Stationary phase population of <i>Escherichia coli</i> for various concentrations in growth medium (LB) after growth in Incubator 1 for 48h (Left). And Stationary phase population of <i>Staphylococcus aureus</i> for various concentrations in growth medium (TSB) after growth in Incubator 1 for 48h (Right). Black arrows show working concentrations.	79
3.5	Growth curves of <i>Escherichia Coli</i> in 15.5g/L of LB at 30°C in droplets in permeable tubings (black triangles), sealed vials (small red diamonds) and sealed vials containing 77% volume of fluorinated oil as gas reservoir (large red diamonds). The small red diamonds with dark edges corresponds to population measured in the sealed vial after allowing gas exchanges by replacing its airtight cap by a permeable one.	80

3.6	Growth curves of <i>Staphylococcus aureus</i> in 80 g/L of TSB at 30°C in droplets (black triangles) and sealed vials (red diamonds). The empty green diamond is the population measured in an opened vial surrounded by air, whereas the filled green diamond is the population measured in the same conditions but with an exclusive nitrogen surrounding gas. Black and red curves are shown as references of, respectively, optimum gas exchanges conditions in droplets, and impossible gas exchanges in sealed vials	80
3.7	Pictures taken from the Petri dish plating of samples of cultures of <i>Saureus</i> after growth in nitrogen atmosphere (top) and air atmosphere (bottom). Black dots are simply inkmarks used to identify individual colonies.	82
3.8	Profile of stationary population P_{max} as a function of oxygen concentration. Oxygen critical value O_2^c and minimum P_{max}^{ana} and maximum P_{max}^{ana} stationary populations corresponds to fitting parameters and depend on the microorganism.	85
3.9	Results obtained by model resolution in the biphasic case (vial with a ratio medium:oil of 4:3). The top left graph presents the configuration and boundary conditions used for the calculations. Top right graph shows the population field in the aqueous phase of the incubator. Bottom left graph displays the oxygen concentration field, and bottom right graph corresponds to the nutrient concentration field. Population and oxygen profiles evidence the apparition of heterogeneities within the medium in this biphasic case.	88
3.10	Results obtained by model resolution in the droplet case (5 μ L droplet in a permeable tube). The top left graph presents the configuration and boundary conditions used for the calculations. Top right graph shows the population field in the incubator. Bottom left graph displays the oxygen concentration field, and bottom right graph corresponds to the nutrient concentration field. Even though a weak gradient appear in the oxygen field, we can notice from these graphs that the whole medium can be considered as homogeneous during growth.	89
3.11	Results obtained by model resolution in the incubator 2/ case (vial with a variable ratio medium:oil). Top left graph shows the population field for a ratio medium:oil of 1:0. Top right graph presents the population in the aqueous phase of the incubator for a ratio 6:1, bottom left graph for a ratio of 4:3, and bottom right graph corresponds to a ratio 2:5. The profile in the absence of oil shows that the medium remains homogeneous in the absence of gas reservoir. When oil can supply oxygen (three other graphs), growth is improved in a small layer close from the interface where diffusion is efficient.	90

3.12	Comparison between experimental and model results for <i>Escherichia coli</i> . Top graph represents the global growth curves obtained from experiments (discrete symbols) and from the corresponding calculations (solid lines). Red data corresponds to growth in incubator 2 (vial), black data to growth in incubator 3 (droplets in permeable tubes), green data to growth in the airtight incubator 3 (droplets in airtight tubes), and magenta data corresponds to growth in incubator 4 (micro-droplets in permeable tubes). Left bottom graph sums up the growth rates measured for each growth configuration as a function of the characteristic length of the incubators. Faint symbols represent the experimental data and bright symbols correspond to the data extracted from the modelings. Right bottom graph uses the same nomenclature to present the stationary phase populations versus the characteristic length of the incubators. . . .	92
3.13	Comparison between experimental and model results for <i>Staphylococcus aureus</i> . Top graph represents the global growth curves obtained from experiments (discrete symbols) and from the corresponding calculations (solid and dot-dashed lines). Red data corresponds to growth in incubator 2 (vial, dark red used for vial without oil for the sake of clarity), black data to growth in incubator 3 (droplets in permeable tubes). The empty symbols and dot-dashed lines corresponds to growth in 80 g/L medium instead of the 30 g/L usually used. Left bottom graph sums up the growth rates measured for each growth configuration as a function of the characteristic length of the incubators. Faint symbols represent the experimental data and bright symbols correspond to the data extracted from the modelings. Right bottom graph uses the same nomenclature to present the stationary phase populations versus the characteristic length of the incubators. . . .	94
4.1	Capillaires de section circulaire en PFA (PerFluoroAlkyl) et carrée en PC (PolyCarbonate). . . .	100
4.2	Schéma d'organisation du contrôle des différents éléments du système automatisé. . . .	102
4.3	Photographie du montage de suivi de croissance automatisé. . . .	103
4.4	Courbes de croissance automatisées en échelle logarithmique	104
4.5	Courbes de croissance automatisées en échelle logarithmique	105
4.6	Formules développées des molécules actives de l'Acticide MBS . . .	114
4.7	Résultats du test d'efficacité de l'Acticide MBS par la méthode de référence	116
4.8	Résultats du test d'efficacité de l'Acticide MBS par la méthode de référence	117
4.9	Formule développée de l'actif du Glokill PQ.	119
4.10	Résultats du test d'efficacité du Glokill PQ à 39h par la méthode de référence.	120

4.11	Résultats du test d'efficacité du Glokill PQ par la méthode de automatisée.	121
4.12	Courbes de croissance de <i>Ecoli</i> dans le LB à 5 g/L en présence d'Acticide MBS, et de Glokill PQ	122
4.13	Fréquence de croissance à 48h sur les répétitions de culture sur système automatisé avec Acticide MBS (à gauche), et temps de latence à 10h, 15h, 20h, et 48h (à droite).	123
4.14	Fréquence de croissance à 48h sur les répétitions de culture sur système automatisé avec Glokill PQ (à gauche), et temps de latence à 10h, 15h, 20h, et 48h (à droite).	124
B.1	Photographie du montage de suivi de croissance automatisé.	137
B.2	Schéma optique pour les mesures de fluorescence.	138
B.3	Schéma optique pour les mesures d'absorbance.	139
B.4	Schéma d'organisation du contrôle des différents éléments du système automatisé.	140
B.5	Séquence d'acquisition automatisée	141
B.6	Séquence de traitement des données automatisée	145
B.7	Séquence de post-traitement des données automatisées	146

Liste des Tableaux

1.1	Composition des milieux de culture liquides utilisés dans cette étude.	5
1.2	Composition du milieu de culture solide utilisé dans cette étude. . .	8
3.1	Reference values of the model parameters used for the illustrative results presentation in figures 3.9 to 3.11.	88
3.2	Fixed parameters values used for the comparison between experiments and modeling of <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> growths.	90
3.3	Fitting parameters values used for the comparison between experiments and modeling of <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> growths	91
4.1	Nombre de microorganismes par goutte	101
4.2	Protocoles de détermination de CMI	111
4.3	Temps de manipulation nécessaire à la détermination de CMI par la méthode de référence	112
4.4	Temps de manipulation nécessaire à la détermination de CMI par la méthode automatisée	113
4.5	Composition des erlenmeyers pour le test d'Acticide MBS	115
4.6	Composition des gouttes pour le test automatisé d'Acticide MBS . .	117
4.7	Valeurs de CMI de l'Acticide MBS déterminées par les méthodes de référence et automatisée.	118
4.8	Composition des échantillons pour le test d'efficacité du Glokill PQ	119
4.9	Valeurs de CMI du Glokill PQ déterminées par les méthodes de référence et automatisée.	122
B.1	Paramètres par défaut des équipements pour le suivi de croissance automatisé	142

Chapitre 1

La microbiologie et ses enjeux industriels

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit se situe à l'interface entre microbiologie et physico-chimie. Le rapprochement de ces deux domaines se justifie par divers arguments, et l'objectif de ce premier chapitre est d'en exposer les plus pertinents vis-à-vis du travail réalisé. Dans un premier temps, nous allons introduire la microbiologie et les méthodes traditionnelles qui y sont associées. Ensuite, nous décrirons les applications industrielles de la microbiologie qui motivent la recherche de techniques innovantes pour l'étude de microorganismes. Puis, nous montrerons comment les techniques de miniaturisation, développées initialement par des physico-chimistes, peuvent répondre à ce besoin, et présenterons quelques exemples d'applications réussies. Enfin, nous verrons comment ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et quels sont les objectifs que nous avons cherché à atteindre.

1.1 Définition et introduction à la microbiologie

Le terme "microbiologie" désigne l'ensemble des méthodes et techniques permettant l'étude des microorganismes et/ou l'application des connaissances qui en sont issues. Le terme "microorganisme" regroupe toutes les formes de vies existantes sous forme de cellule unique ou de groupes d'individus unicellulaires (bactéries, levures, champignons, moisissures, ...). Les virus, non cellulaires, sont également inclus dans cet ensemble. Toute cette biomasse microscopique est extrêmement riche en informations. En effet, elle contient une impressionnante diversité qui apporte des réponses clés dans l'étude de l'apparition du vivant, de

l'apparition et transmission de certaines maladies, ou encore dans le fonctionnement des cellules d'organismes pluricellulaires dits "avancés". Enfin, les innombrables voies métaboliques utilisées par les microorganismes pour leur survie et leur multiplication dépassent de loin les connaissances humaines en termes de capacité de transformation chimiques et méritent une attention toute particulière.

Pour toutes ces raisons, de nombreuses méthodes ont été développées depuis la découverte de cette vie microscopique par Antoni van Leeuwenhoek[5], au *XVII^{ème}* siècle, afin d'en découvrir les secrets. Sans prétendre en faire une liste exhaustive, nous présentons dans ce Chapitre les méthodes qui ont fait leurs preuves et se sont imposées comme références en matière de culture de microorganismes en laboratoire et dénombrement de population.

1.1.1 La croissance microbiologique

Dans des conditions favorables à leur développement, la croissance des microorganismes répond à un schéma décrit par Jacques Monod en 1949[6] et qui comprend les phases suivantes:

1. Phase de latence: la croissance est nulle, les microorganismes sont actifs physiologiquement, mais ne se répliquent pas;
2. Phase d'accélération: la croissance n'est plus nulle et augmente progressivement, certains microorganismes commencent à se répliquer, puis de plus en plus se divisent, jusqu'à ce qu'ils se répliquent tous à intervalles de temps réguliers, ;
3. Phase exponentielle: la vitesse de division des microorganismes est constante, tous les microorganismes se répliquent à intervalles de temps réguliers;
4. Phase de ralentissement: la vitesse de division des microorganismes diminue, certains microorganismes cessent de se répliquer, puis de plus en plus, jusqu'à ce que plus aucun ne se divise;
5. Phase stationnaire: la croissance est nulle, les microorganismes ne se répliquent pas mais sont tous vivants;
6. Phase de déclin: le nombre de microorganismes décroît, les microorganismes meurent progressivement.

La Figure 1.1 illustre l'évolution d'une population de microorganismes suivant cette évolution.

L'obtention de ces courbes requiert la capacité d'apporter aux microorganismes ce dont ils ont besoin pour se développer, ainsi que la possibilité de les

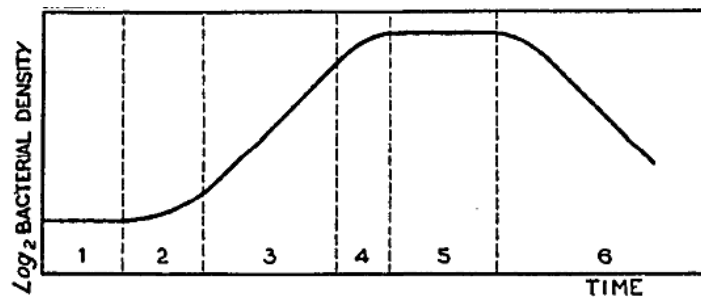


FIGURE 1.1: Evolution d'une population de microorganismes en fonction du temps. (Reproduit à partir de la référence *Monod*[6])

dénombrer. Nous allons maintenant présenter les techniques de laboratoire qui ont été mises au point de façon à satisfaire ces deux conditions.

1.1.2 Les méthodes de culture

On appelle culture de microorganismes les techniques permettant le maintien en vie et/ou le développement de populations de microorganismes de façon contrôlées[7]. Pour cela, il est nécessaire de satisfaire aux besoins nutritifs des microorganismes en question. La grande diversité des voies métaboliques existantes implique une grande diversité de ces besoins nutritifs. Il serait donc impossible de décrire les conditions optimales de croissance de chaque organisme. En revanche, il est possible de définir de grandes classes de métabolisme. Par exemple, les microorganismes peuvent être classés selon leur affinité vis-à-vis de l'oxygène: anaérobies strictes s'ils ne survivent qu'en absence totale d'oxygène, aérobies facultatifs s'ils sont capables de se multiplier en cas d'absence et de présence d'oxygène, anaérobies aérotolérants s'ils n'ont pas besoin d'oxygène pour se multiplier mais qu'il ne leur est pas nuisible, microaérobies s'ils se développent uniquement en cas de très faible présence d'oxygène, et enfin aérobies stricts s'ils ne survivent qu'en présence d'oxygène. De la même façon, les microorganismes peuvent être classés selon leur capacité à utiliser des sources de carbone organique uniquement (chimio-organotrophes), inorganique (chimioolithotrophes) ou à ne nécessiter que

la présence de lumière (phototrophes). D'autres critères permettant la classification des microorganismes (température, pression, salinité, pH, ...) existent mais ne seront pas détaillés. Nous allons ici décrire les méthodes de culture en suspension en milieu liquide et sur milieu solide qui rendent possible la croissance de la majorité des classes décrites précédemment.

1.1.2.1 La culture en milieu liquide

La culture de microorganismes en milieu liquide requiert la préparation d'un bouillon, stérile, dans lequel on introduit une population initiale choisie, appelée inoculum[7]. L'asepsie doit être maintenue durant toute la phase de culture, et l'échantillon doit être suffisamment agité pour que la biomasse reste en suspension. Si ces conditions sont respectées et que le milieu contient les éléments nécessaires, l'inoculum peut se maintenir en vie, voire se développer.

Un milieu de croissance pour microorganismes doit contenir tous les éléments nécessaires au métabolisme des cellules. Comme discuté précédemment, ces éléments peuvent varier selon le type de microorganisme, il est cependant possible de les classer en trois groupes: les macronutriments (C, N, P, S, K, Mg, Ca, Na) sont utilisés en quantités importantes dans le milieu, les micronutriments (B, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, W, V, Zn) doivent être présents mais en quantités très faibles voire à l'état de traces, et enfin les facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, ...) sont des molécules complexes, nécessaires en faibles quantités, que le microorganisme n'est pas capable de synthétiser lui-même à partir des macros et micronutriments.

Parmi les milieux utilisés, il est possible de dissocier les milieux définis chimiquement des milieux complexes. Les milieux définis chimiquement ont une composition choisie de façon à ce que les quantités de tous les éléments cités ci-dessus soient connues. Les milieux complexes sont issus de digestions protéolytiques de produits animaux ou végétaux. Ils contiennent donc tous les éléments nécessaires à la croissance mais la concentration en chaque espèce ne peut être contrôlée de façon précise. Quelle que soit leur nature, les milieux de culture se présentent le plus souvent sous la forme d'une poudre à disperser dans de l'eau déminéralisée. Nous présentons la composition des milieux liquides utilisés dans cette étude dans le tableau 1.1

Luria Broth (LB)		Tryptic Soy Broth (TSB)	
<i>Composé</i>	<i>Conc. (g/L)</i>	<i>Composé</i>	<i>Conc. (g/L)</i>
Digestion pancréatique de caséine	17	Digestion pancréatique de caséine	10
Digestion papaïque de soja	3	Extrait de levure	5
Glucose	2.5	Chlorure de sodium	0.5
Chlorure de sodium	5		
Phosphate de potassium	2.5		

TABLEAU 1.1: Composition des milieux de culture liquides utilisés dans cette étude.

Les microorganismes étant présents partout dans l'environnement, il est crucial de disposer de méthodes permettant d'éliminer les populations indigènes de façon à pouvoir cultiver uniquement les souches voulues. Les techniques de stérilisation ont été développées dans cet objectif. Il existe plusieurs méthodes permettant de stériliser un milieu de culture et de conserver des conditions aseptiques tout au long de la croissance[8–12], nous ne présenterons ici que celles qui ont été utilisées pour ces travaux de thèse.

La stérilisation de milieux liquides s'effectue principalement par autoclavage. Cela consiste à placer les milieux en question dans une enceinte hermétique en présence d'eau. Le chauffage de l'eau dans l'enceinte étanche entraîne la production de vapeur saturée permettant d'atteindre des températures supérieures à 100°C. Un exemple de cycle classique de stérilisation par autoclavage est un maintien à 121°C pendant 15 minutes des échantillons. Un tel cycle permet l'inactivation d'une très grande majorité de microorganismes et donne donc accès à des conditions de stérilité satisfaisantes pour des études microbiologiques classiques. Dans le cas de travail avec des organismes résistants il est nécessaire d'adapter le cycle d'autoclavage[13], ou bien d'utiliser une méthode différente. Une de ces techniques alternatives est la microfiltration[14]. La plupart des microorganismes ayant des tailles supérieures à 0.5 micromètres, un passage à travers une membrane de filtration d'un diamètre de pore inférieur à cette dimension (le plus souvent 0.2 micromètres) permet également d'atteindre des conditions satisfaisantes de stérilité. Encore une fois, certains microorganismes peuvent ne pas être éliminés par cette méthode. Si l'autoclavage et la filtration se révèlent insuffisants, il existe alors d'autres méthodes de stérilisation, moins répandues, telles que

l'exposition aux UV et les traitements chimiques, et qui ne seront pas détaillées ici.

La stérilité obtenue par ces méthodes peut cependant être compromise pendant la culture dans le cas où des opérations sont nécessaires au cours de la culture (prélèvement, introduction d'électrode, ...). Pour éviter cela, chaque instrument ou produit qui entre en contact avec le milieu doit être stérile. De plus, la manipulation doit se faire dans une atmosphère stérile car des contaminants (spores, ...) peuvent être transportés dans l'air. Une méthode classique consiste à placer une flamme à proximité de chaque manipulation au cours de laquelle l'enceinte stérile est ouverte. Elle présente l'avantage de ne nécessiter que peu de matériel et d'être déplaçable. Ceci permet par exemple de garder stérile l'orifice d'un fermenteur contenant plusieurs litres pendant une phase de prélèvement, alors qu'il serait difficile de maintenir le bioréacteur intégralement en atmosphère stérile. En revanche, pour le travail en laboratoire sur des volumes plus faibles (souvent inférieurs au litre), il est plus aisé de réaliser les manipulations sous un poste de sécurité microbiologique (PSM, Figure 1.2) qui offre une enceinte entièrement stérile.



FIGURE 1.2: Poste de sécurité microbiologique (www.thermoscientific.com).

Les méthodes décrites ci-dessus sont applicables pour tout type de microorganisme qui peut être cultivé en suspension. Pour de multiples raisons, il peut cependant être nécessaire de cultiver les microorganismes sur un milieu solide. Nous présentons les techniques spécifiques à ce mode de culture dans la sous-partie suivante.

1.1.2.2 La culture sur milieu solide

L'objectif d'une culture sur milieu solide est identique à celui d'une culture liquide[7]. En effet, il consiste à apporter les nutriments nécessaires, dans des conditions d'asepsie satisfaisantes pour permettre la survie et/ou la croissance d'une population de microorganismes issue d'un inoculum choisi. Du fait de cette similarité, les milieux solides ont bien souvent la même composition que les milieux liquides, à la présence près de gélose. L'intérêt d'une culture sur milieu gélosé plutôt qu'en milieu liquide peut être varié mais il trouve sa principale application dans le comptage sur boîte de Pétri (méthode décrite dans la partie suivante). Hormis cette méthode, la culture sur milieu solide est également utilisée pour conserver des souches en tubes inclinés dits "slants", ou bien pour séparer les souches d'un échantillon par isolement sur boîte de Pétri.

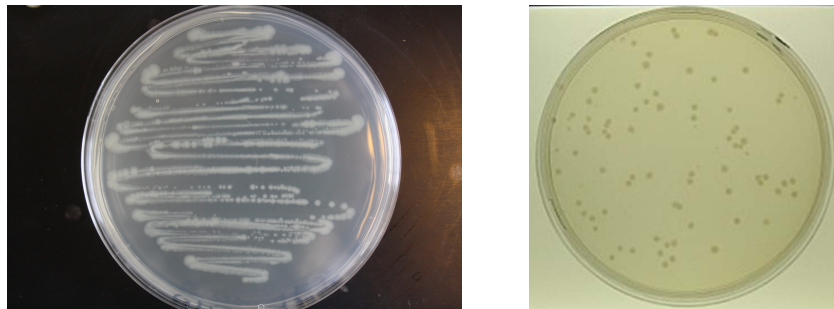
Pour la préparation d'un tel milieu, il est nécessaire de monter en température afin de faire fondre la gélose. Cette étape peut être directement réalisée lors de la stérilisation par autoclavage. Avant refroidissement et durcissement, le milieu gélosé est coulé dans un contenant adapté au type de culture que l'on souhaite réaliser (tubes, boîtes de Pétri, ...). Nous utilisons un milieu solide dans cette étude à des fins de dénombrement de populations, sa composition est décrite dans le tableau 1.2

Pour disposer des microorganismes sur milieu gélosé, il existe deux méthodes. La première technique consiste à couler le milieu gélosé chaud dans la boîte de Pétri, le laisser refroidir et gélifier, puis étaler l'échantillon à dénombrer sur la surface (Exemples de colonies obtenues après étalement dans la Figure 1.3). La seconde technique nécessite un contrôle de la température du milieu de façon à le maintenir en surfusion à 40°C environ. L'échantillon est alors déposé en premier dans la boîte de pétri, puis recouvert par le milieu gélosé. Enfin, le tout est homogénéisé par une agitation douce. Le contrôle de la température du milieu est, dans ce cas, crucial car il doit être suffisamment chaud pour que la gélose reste liquide mais sans dépasser pour autant la tolérance des microorganismes.

Les méthodes décrites dans ces deux dernières sous-parties autorisent la croissance et le dénombrement des microorganismes. Elles ont notamment permis d'identifier un schéma de croissance commun à la majorité des microorganismes

Nutrient Agar (NA)	
<i>Composé</i>	<i>Conc. (g/L)</i>
Extrait de boeuf	3.0
Peptone	5.0
Agar	15.0

TABLEAU 1.2: Composition du milieu de culture solide utilisé dans cette étude.

FIGURE 1.3: Exemples de cultures sur milieu solide de *Escherichia coli*. A gauche, 24 heures après étalement avec une anse d'inoculation d'un inoculum liquide concentré. A droite, 24 heures après étalement d'une suspension diluée à l'aide d'un étaleur en "L".

et que nous présentons dans la sous-partie suivante.

1.1.3 Le dénombrement de populations

Nous venons de voir les conditions à rassembler afin de favoriser la survie et la croissance de microorganismes. De façon à pouvoir caractériser l'évolution d'une population mise en culture, il est également nécessaire de pouvoir connaître le nombre d'individus au cours du temps. Cependant, étant donné la dimension microscopique des cellules, il est très difficile, voire impossible, de les compter directement. Ainsi, la plupart des méthodes utilisées pour suivre l'évolution d'une population sont des dénombrements indirects. Nous allons tout d'abord présenter les deux méthodes de comptage les plus éprouvées et qui restent largement utilisées : le comptage sur boîte de Pétri, et la mesure de densité optique. Nous citerons ensuite d'autres méthodes qui offrent des avantages et inconvénients variés et donc des champs d'application différents.

1.1.3.1 Le comptage par dilutions successives

La méthode de comptage par dilutions successives et étalement sur boîte de pétri[7] est l'une des rares méthodes donnant accès à une mesure quantitative de la concentration en cellules viables. C'est-à-dire qu'elle permet de dénombrer uniquement les cellules vivantes et capables de se diviser.

Le principe de cette technique repose sur le fait qu'un microorganisme viable isolé, placé dans des conditions favorables sur un milieu gélosé, se réplique[15]. Ainsi, si un microorganisme (invisible à l'oeil) est déposé sur un milieu favorable à sa réplication, après plusieurs générations, il donne lieu à une colonie visible à l'œil nu. En parvenant à séparer les microorganismes microscopiques d'un échantillon et en les laissant se multiplier indépendamment, on parvient à compter les colonies macroscopiques descendantes d'individus uniques.

En pratique, un échantillon de la suspension de microorganismes à évaluer est étalé sur milieu gélosé dans une boîte de Pétri et incubée pour laisser les microorganismes se diviser. On obtient alors un nombre de colonies visibles équivalent au nombre de microorganismes, invisibles, initialement étalés. Pour que le comptage soit fiable, il faut que le nombre d'individus présents sur le milieu gélosé soit suffisant pour que l'on puisse considérer l'échantillon comme représentatif de la population moyenne. Mais il ne doit pas être trop élevé, pour que chaque colonie soit suffisamment éloigné de ses plus proches voisines pour être isolée. Par ailleurs, il est toujours possible que quelques microorganismes soient restés côte-à-côte lors de l'étalement. On exprime donc le résultat en concentration d'unités formant colonie (UFC) et non en concentration de microorganismes. Il est généralement admis qu'un nombre de colonies compris entre 20 et 300 est satisfaisant pour un comptage réalisé sur une boîte de pétri d'environ 9 centimètres de diamètre.

Les populations de microorganismes peuvent atteindre des valeurs supérieures à la dizaine de milliards, tout comme être égales à 1 voire nulle. Ainsi, pour satisfaire au critère imposé par la méthode, il faut donc préparer les échantillons avant de procéder à l'étalement. Pour le dénombrement d'un échantillon donné, il est donc nécessaire de procéder à des dilutions successives de la culture initiale. Une méthode courante consiste à prélever 1 millilitre du milieu contenant la population à dénombrer, et à le diluer dans 9 millilitres de solution Ringer (solution de sels assurant une pression osmotique suffisante pour la survie des microorganismes

mais dépourvue de substrats nécessaires à la croissance). La solution obtenue contient alors une population dix fois plus faible que l'originale. En diluant à nouveau 1 millilitre de la solution obtenue dans 9 millilitres de Ringer et en répétant l'opération autant que nécessaire, il est possible d'obtenir une gamme de dilution de la population initiale. Puis, en étalant 0.1 millilitre de chaque dilution sur boîte de Pétri, on garantit qu'au moins une des boîtes aura reçu un nombre d'UFC compris entre 20 et 300, à condition bien sûr que la population dans la culture initiale soit supérieure à 20. La Figure 1.4 illustre cette méthode. Bien qu'elle soit fiable pour beaucoup de microorganismes, cette méthode présente l'inconvénient d'être très lourde en termes de temps de manipulation. De plus, certains microorganismes ne se cultivent pas (ou difficilement) sur milieu gélosé. D'autres méthodes de dénombrement ont donc été développées, parmi lesquelles la mesure de densité optique qui est détaillé dans le paragraphe suivant.

1.1.3.2 La mesure de densité optique

Le suivi de population par mesure de densité optique (DO) s'appuie sur le changement de propriétés optiques d'une culture selon la quantité de microorganismes qu'elle contient[7]. L'augmentation sur plusieurs ordres de grandeurs du nombre d'individus en suspension entraîne une baisse de la transmissivité du milieu. Ainsi, la turbidité fluctue de façon proportionnelle à la population, tout au moins pendant les phases d'augmentation de biomasse[6] et pour des concentrations supérieures à la limite de détection.

La Figure 1.5 donne un exemple de montage classique pour la mesure de DO. Expérimentalement, il suffit de prélever un petit volume de culture et de le placer, dans une cuve de spectrométrie adaptée, sur le trajet optique reliant une source lumineuse à un capteur. On mesure en général le rapport entre la quantité de lumière de longueur d'onde 600 nanomètres qui parvient à traverser l'échantillon d'une part, et celle qui traverse un échantillon référence (eau distillée par exemple) d'autre part.

Le calcul de DO s'écrit ensuite comme un calcul d'absorbance:

$$DO = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1.1)$$

Avec I l'intensité lumineuse qui traverse l'échantillon, et I_0 celle qui traverse la référence. La mesure est quasi-instantanée et linéaire vis-à-vis de la population

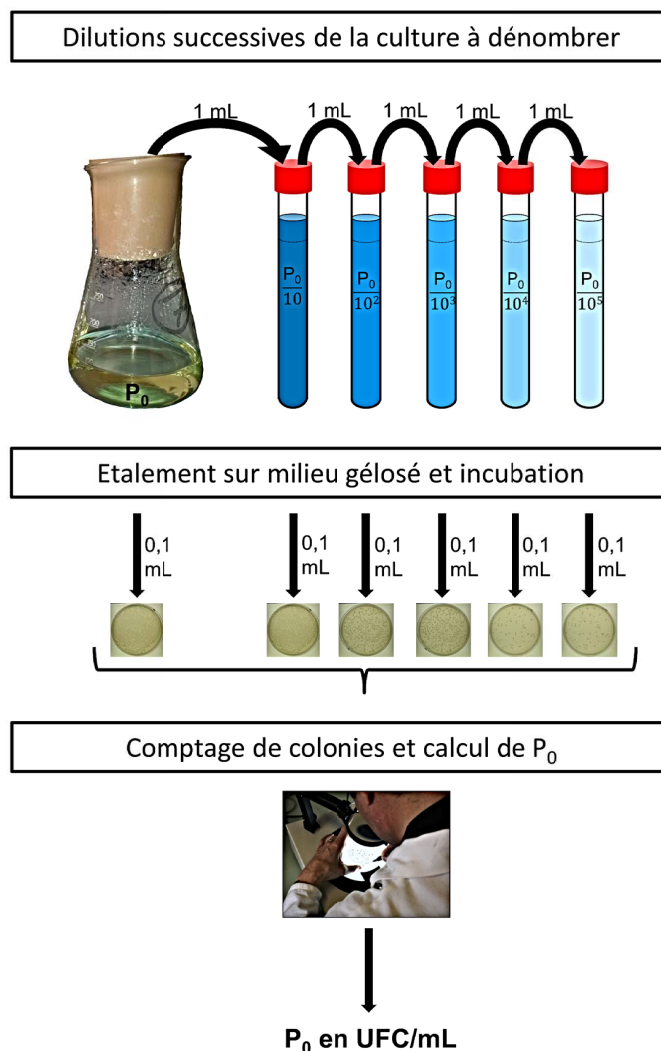


FIGURE 1.4: Méthode de dénombrement de population par dilutions successives et comptage de colonies sur boîte de Pétri.

pour une certaine gamme de concentrations. La majorité du temps, la DO est admise comme linéaire pour des valeurs comprises entre 0 et 0.8, soit pour un milieu absorbant entre 0 et 80% de lumière en plus que la référence. Pour des milieux plus absorbants, la DO est simplement mesurée après dilution de l'échantillon puis corrigée par le taux de dilution.

On note cependant que la relation linéaire reliant la DO à la population doit être établie pour chaque microorganisme et nécessite un étalonnage avec des cultures où le nombre de microorganismes est connu[6]. Un comptage sur boîte de Pétri simultané à des mesures de DO permet de réaliser cet étalonnage. La simplicité et rapidité de la mesure de DO explique la large préférence pour cette méthode une fois l'étalonnage réalisé, mais on comprend facilement que d'autres

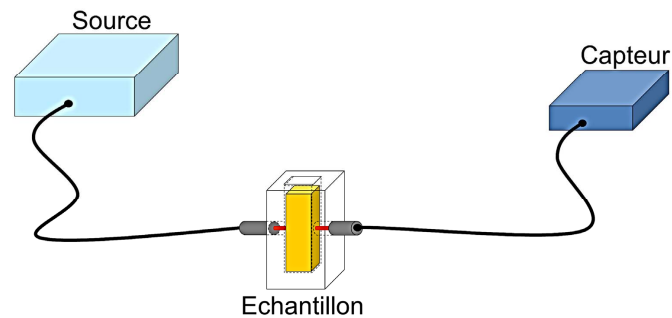


FIGURE 1.5: Méthode de mesure de la densité optique (DO) d'une culture de microorganismes.

méthodes aient été envisagées pour les cas où il est impossible de réaliser un étalonnage ou bien encore dans les cas où la suspension de microorganismes n'est pas homogène (densité optique variable à l'intérieur d'une même culture). Nous allons présenter maintenant quelques-unes de ces méthodes alternatives.

1.1.3.3 Autres méthodes de dénombrement

Parmi les autres méthodes de suivi d'évolution de populations, nous en décrirons quatre qu'il nous semble nécessaire de citer quand on parle de dénombrement de microorganismes. Sans rentrer dans les détails expérimentaux, nous allons tenter d'en exposer les principaux avantages et inconvénients qui peuvent justifier leur utilisation en complément ou en place des méthodes décrites précédemment:

- Nombre le plus probable (MPN):

La première méthode que nous décrivons est la détermination du "nombre le plus probable" [16]. Pour expliquer son principe, nous présentons d'abord la loi de Poisson qui donne la probabilité $p(k)$ d'obtenir un nombre d'occurrence k d'un phénomène dont l'occurrence moyenne est λ :

$$p(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda} \quad (1.2)$$

La Figure 1.6 représente le type de distributions obtenues pour différentes valeurs de λ . En pratique, cette loi permet donc d'estimer la probabilité de compter k microorganismes par unité de volume dans un milieu qui en contient en moyenne λ . Ou à l'inverse, d'estimer la population moyenne λ d'un échantillon en mesurant le nombre k de microorganismes par unité de volume à plusieurs reprises, et d'en calculer la probabilité. Une façon courante d'appliquer cette méthode est de réaliser des dilutions successives de l'échantillon à dénombrer, en préparant plusieurs répliquas de chaque dilution, et en observant par une méthode simple les dilutions pour lesquelles une population s'est à nouveau développée (densité optique par exemple). L'analyse de la fréquence à laquelle il y a eu croissance, ou non, permet alors d'estimer la population initiale de l'échantillon. Le calcul de cette population dépend de la méthode choisie (nombre de dilutions, nombre de répliquas par dilution, etc...) et ne sera pas détaillé ici.

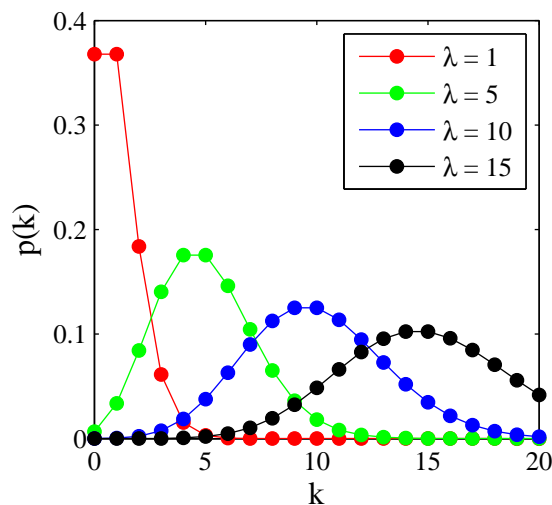


FIGURE 1.6: Tracé de la loi de Poisson qui donne la probabilité d'obtenir k occurrences d'un événement (exemple: présence d'un microorganisme) dans un échantillon dont la moyenne est de λ occurrences.

- Détermination de masse sèche:

La détermination de masse sèche est la méthode la plus ancienne et la plus directe de mesure de population[6]. Le principe de la méthode est de mesurer la masse sèche d'un volume donné de culture, c'est-à-dire la masse après

centrifugation, rinçage du surnageant, et évaporation de l'eau restante. La masse obtenue après séchage du culot de centrifugation correspond à la masse totale des cellules présentes dans le prélèvement initial. La méthode peut être considérée comme quantitative sous réserve de connaître la masse d'un microorganisme mais nécessite une quantité relativement importante de culture à chaque mesure pour obtenir une mesure fiable. De plus, le long temps de séchage (quelques heures à une journée) en fait une technique lourde pour des suivis de culture routiniers.

- Comptage microscopique direct:

Le nombre de microorganismes dans une population peut être directement mesuré par comptage au microscope. Plusieurs types de dispositifs existent pour cela, appelés "cellules de comptage" (de Malassez, de Thoma, etc...). Le principe commun à ces cellules est la segmentation d'une surface, telle qu'une lame de verre, en petites zones d'aires bien définies. Ces zones sont gravées dans la surface de façon à ce qu'en déposant une goutte dessus et en recouvrant avec une lamelle, un volume connu de culture soit emprisonné. En comptant au microscope le nombre de microorganismes par zone, on obtient un nombre d'individus par volume emprisonné, c'est-à-dire une concentration. La Figure 1.7 schématise une cellule de comptage. Un marqueur coloré peut être ajouté à l'échantillon si l'on souhaite différencier les microorganismes vivants des microorganismes morts. L'intérêt de cette méthode est donc de proposer une mesure directe et rapide de la population. Cependant, l'échantillon doit être suffisamment concentré pour que la mesure soit réalisable étant donné les faibles volumes mis en jeu, et le comptage doit être répété sur suffisamment de zones pour obtenir une mesure fiable. Enfin, certains microorganismes trop petits peuvent être difficilement visibles et donc donner des mesures biaisées.

- Cytométrie en flux:

Le principe de la cytométrie en flux est de faire défiler, l'une après l'autre, les cellules à dénombrer dans le chemin optique d'un laser, ou entre deux électrodes, et de suivre les fluctuations de signal engendrées. Cette technique a d'abord été développée pour détecter des particules de tout type

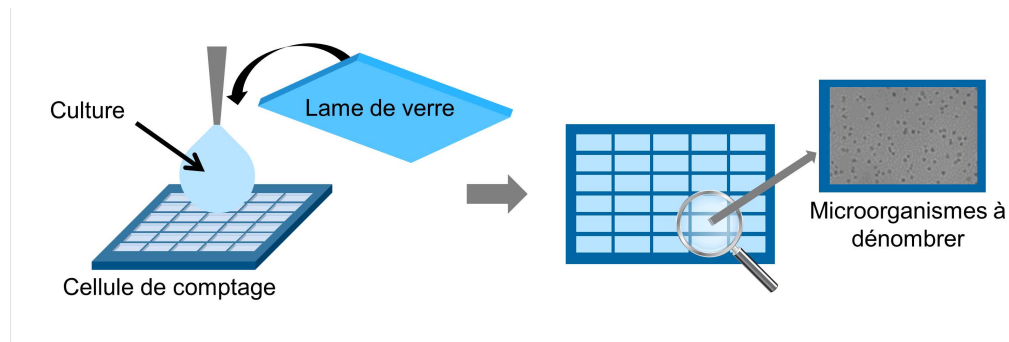


FIGURE 1.7: Principe d'utilisation d'une cellule de comptage de microorganismes.

en suspensions par *Coulter et al*[17] puis appliquée plus particulièrement à la détection et au tri de cellules[18]. La possibilité de mesurer un signal caractéristique de chaque microorganisme en fait un outil particulièrement intéressant pour étudier des différences au sein d'une même population. En ce qui concerne le dénombrement de population, la technique s'applique de façon satisfaisante dans le cas de cultures peu concentrées et facilement dispersibles. En revanche, la nécessité de faire défiler les microorganismes un par un la rend difficilement utilisable pour la quantification de fortes populations ou bien pour le dénombrement de cellules ayant tendance à s'agréger. Ainsi, bien que particulièrement intéressante et potentiellement riche en information, cette méthode présente des limites[19] qui rendent son utilisation difficile dans certains cas. Enfin, le matériel spécifique nécessaire à cette méthode fait qu'elle est moins utilisée dans le cadre de suivi de population courant.

- Marqueurs d'activité cellulaire:

La dernière méthode que nous évoquons ici est la mesure d'activité cellulaire[20–22]. C'est une mesure indirecte de population qui consiste à introduire un marqueur (molécule) dans un milieu de culture qui va prendre part dans les réactions métaboliques des microorganismes. Ces marqueurs sont choisis pour leur capacité à être détectés et quantifiés dans le milieu (fluorescence le plus souvent). Ainsi on peut suivre, par exemple, la disparition d'un marqueur dégradé par les microorganismes. L'estimation de la population est obtenue par calibration. Dans l'exemple donné ci-dessus, la cinétique de disparition du marqueur sera proportionnelle au nombre de

cellules présentes et l'on pourra donc calculer ce nombre par mesure de la cinétique de dégradation. L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas de comptage direct des microorganismes et peut donc être utilisée dans le cas où les méthodes directes ne sont pas applicables. Elle peut également être utile dans le cas de populations diluées. En revanche, le choix d'un marqueur adapté, la calibration, et les méthodes d'analyses nécessaires pour le suivi du marqueur en font une technique complexe à mettre en place.

Toutes ces méthodes ont permis depuis des décennies à la microbiologie de se développer et de progresser en évoluant avec elle. Cependant, comme nous l'avons détaillé pour chaque méthode, il existe toujours des limitations qui poussent à continuellement améliorer les techniques existantes et/ou à en développer de nouvelles pour répondre à de nouvelles problématiques. Parmi les sources de motivations, les besoins toujours plus avancés de contrôles microbiologiques en industrie occupent une place importante et représentent un des enjeux de ce travail de thèse. Nous allons présenter maintenant un aperçu des types de problématiques microbiologiques qui se rencontrent en industrie.

1.2 Les enjeux industriels de la microbiologie

Il existe diverses motivations dans le domaine industriel qui poussent à s'intéresser à la microbiologie. Pour commencer nous allons présenter l'intérêt de pouvoir contrôler le développement de microorganismes, voire de l'empêcher complètement. Cela requiert des méthodes de régulation de croissance mais également des techniques de suivi d'évolution de population afin de pouvoir vérifier l'efficacité de ces premières. Nous parlerons ensuite des bioprocédés pour lesquels il est au contraire nécessaire de favoriser la conversion métabolique microbienne, mais toujours de façon contrôlée. Enfin, nous évoquerons l'utilisation des microorganismes à des fins de génération et stockage d'énergie.

1.2.1 L'hygiène industrielle

Dans les unités de production industrielle, il est bien souvent nécessaire de satisfaire à des critères de non-contamination des produits[23]. En premier lieu, cela permet d'offrir des conditions de travail saines dans lesquelles les manipulateurs ne courent pas le risque d'être contaminés par des agents pouvant être

pathogènes. Ensuite, le cahier des charges interne, ou imposé par le client, requiert dans certains domaines (agroalimentaire, cosmétique, etc. . .)[24, 25] des niveaux de présence microbienne inférieurs à une valeur seuil au-delà de laquelle le produit pourra être refusé et donc entraîner des pertes financières pour le producteur. La préservation des installations de production nécessite également une régulation du nombre de microorganismes présents. Cela afin d'éviter leur dégradation ou la diminution de leur efficacité par l'apparition notamment de biofilms[26] (dépôt bactérien en film sur une paroi) qui peuvent gêner les écoulements dans les canalisations. Enfin la préservation des produits en eux-mêmes peut être altérée par une présence excessive de microorganismes. Leur apparence, odeur ou efficacité peut ainsi être modifiée par un développement microbien excessif et entraîner leur mise au rebut.

Le contrôle microbiologique sur les sites de production requiert donc des techniques pour éviter les développements microbiens et, par conséquence, des méthodes de suivi de populations afin de pouvoir évaluer ces niveaux de contamination. Pour ce qui est de la limitation de croissance, l'utilisation de molécules biocides (ou conservatrices) est largement répandu. Cependant, ces molécules ayant dans la majorité des cas un impact nocif sur l'environnement, la caractérisation de leur efficacité et de leur écotoxicité représente un réel enjeu : d'une part pour en utiliser la quantité optimale (intérêts économiques et environnementaux), et d'autre part pour explorer de nouvelles molécules capables d'exprimer les mêmes propriétés biocides qu'une référence mais avec une toxicité-écotoxicité plus faible (mise en conformité avec les réglementation récentes type REACH).

1.2.2 Les bioprocédés

Les microorganismes sont les premiers êtres vivants qui sont apparus sur Terre. Dans des conditions parfois très hostiles à la vie, ils ont montré la capacité de survivre et de se multiplier en utilisant tout type de source d'énergie qu'ils pouvaient rencontrer. On les retrouve aujourd'hui dans tout échantillon d'eau ou de terre, dans les organismes pluricellulaires, dans des puits de gaz ou de pétrole, etc. . . Pour s'adapter à tous les types de conditions dans lesquelles ils se trouvent, les microorganismes possèdent un potentiel gigantesque en termes de réactions métaboliques. Leur objectif étant de dégrader un produit en métabolite pour en tirer de l'énergie. Cependant, les modifications chimiques des produits en métabolites peuvent offrir des voies de synthèse industrielles très

intéressantes[27]. Soit en permettant la production de molécules que l'on ne sait pas synthétiser par voie chimique classique, soit en améliorant le procédé (meilleur rendement, meilleure sélectivité, moins énergivore, etc...). Dans cette optique, il existe plusieurs branches de l'industrie actuelle qui s'intéressent au potentiel des microorganismes.

Un de ces domaines est la production d'antibiotiques[28, 29]. En effet, certains microorganismes produisent des molécules visant à limiter la multiplication d'autres microorganismes concurrents dans leur environnement. Ces molécules complexes et difficiles à synthétiser peuvent donc être directement extraites à partir de cultures microbiennes choisies. Un des exemples les plus connus est la pénicilline[30], un antibiotique produit par des moisissures du genre *Penicillium*. Ce type de production à visée pharmaceutique a été largement développé pour sa capacité à fournir des molécules à forte valeur ajoutée qui ne peuvent pas forcément être obtenue par chimie classique.

L'application de la bio-production pour des molécules à plus faibles valeurs ajoutées et dont le volume de production doit être important a également fait ses preuves (biodiesel, ...). Toutefois, la conduite de bio-réacteurs est en général plus sensible que celle de réacteurs classiques. La complexité des installations et le manque de flexibilité limitent l'utilisation des bio-procédés à l'heure actuelle. Mais les normes environnementales qui ne cessent d'évoluer dirigent de plus en plus les industriels vers des solutions alternatives aux procédés classiques et les bio-procédés bénéficient, grâce à ce contexte, d'un réel engouement. L'optimisation de voies métaboliques choisies chez les microorganismes encourage donc le développement de méthodes d'étude de comportement microbien. En effet, la capacité de tester un grand nombre de conditions de culture tout en étant capable de suivre la production d'un métabolite voulu est indispensable pour permettre la production de gros volumes à des coûts raisonnables.

Enfin, il est important de citer également l'utilisation des microorganismes à des fins de dépollution[31]. Le principe de fonctionnement d'une station d'épuration [32], par exemple, repose en partie sur l'optimisation de croissance des microorganismes qui utilisent les contaminants chimiques de l'eau comme substrats et les transforment en énergie et en métabolites non polluants[33–35]. D'autres types de déchets peuvent être traités grâce aux microorganismes, et on retrouve ici encore

le besoin d'outils de caractérisation de croissance microbienne pour optimiser ces traitements[36].

1.2.3 Les bioénergies

Nous présentons ici un dernier domaine d'application de la microbiologie en contexte industriel, la production d'énergie. La demande constamment croissante d'énergie dans le monde devant faire face à des ressources fossiles limitées, les dernières décennies ont vu fleurir tout un panel de technologies pour la production d'énergies "alternatives". Parmi des méthodes qui se sont déjà répandues telles que le photovoltaïque ou l'éolien, le potentiel des microorganismes à produire de l'énergie à partir de substrats bons marchés et abondants, ou à partir de la lumière du soleil, focalise bon nombre de travaux. Nous en évoquons ici trois qui nous paraissent principaux: la production d'hydrogène, la production de biocarburants, et les biopiles.

L'hydrogène se propose comme une source d'énergie candidate au remplacement de l'énergie fossile[37]. Son utilisation dans les piles à hydrogène a d'ores et déjà fait ses preuves à échelle moyenne, mais la question de son approvisionnement se pose pour envisager des déploiements mondiaux de ce type de dispositifs. La production d'hydrogène par fermentation ou photosynthèse offre une réponse possible à ce problème[38].

Une autre alternative aux hydrocarbures d'origine fossile est leur production par voie biologique[39]. Le principe de base est identique à la bioproduction d'hydrogène dans le sens où l'on exploite le potentiel de conversion des microorganismes pour obtenir des produits possédant une grande quantité d'énergie stockée sous forme chimique, à partir de déchets ou de substrats peu chers et abondants. La différence se fait uniquement sur leur utilisation. Quand l'utilisation de l'hydrogène nécessite l'utilisation de piles adaptées, les biocarburants, biodiesels ou bioéthanol peuvent suivre les parcours de transformations mis au point pour leurs équivalents fossiles.

Dans les deux exemples précédents, les microorganismes sont utilisés pour leur capacité à convertir de l'énergie solaire par exemple, en énergie chimique. Cependant, certains microorganismes ont la capacité de faire circuler des électrons

hors de la cellule au cours de leur cycle cellulaire. Cette propriété rend possible la génération directe de courant électrique à partir d'une population de microorganismes actifs. C'est sur ce concept que reposent les biopiles[40]. La conception des biopiles permet aux électrons extra-celullaires générés par les microorganismes de voyager jusqu'à une électrode, créant ainsi un courant électrique.

Dans ces trois applications de bioproduction d'énergie, il apparaît clairement comme un enjeu d'optimiser la conversion des microorganismes en adaptant au mieux les conditions opératoires. D'où un besoin crucial d'outils de test rapides pour obtenir le meilleur de ces applications.

Au vu des diverses applications industrielles décrites dans cette sous-section, une problématique qui revient très régulièrement est la nécessité de réaliser des tests de croissance rapides et en grande quantité. Que ce soit pour trouver comment empêcher leur développement, ou pour l'optimiser, ce besoin motive le développement d'outils adaptés. Dans la partie suivante, nous allons présenter le concept de miniaturisation et ses applications en microbiologie qui visent, entre autres, à répondre à ce besoin.

1.3 La miniaturisation pour la microbiologie

Dans le cadre de ce travail, nous restreignons le terme "miniaturisation" à deux types d'outils dont le principe de fonctionnement est identique mais qui couvrent respectivement des échelles de taille d'ordre millimétrique et micrométrique. Plus précisément, nous nous intéressons à la millifluidique, c'est-à-dire l'ensemble des outils et techniques qui permettent la manipulation de fluides (écoulement, stockage, ...) avec au moins une dimension qui est de l'ordre millimétrique, et à la microfluidique, outils équivalents dont au moins une dimension est de l'ordre micrométrique. Les détails techniques associés à la millifluidique et à la microfluidique sont décrits dans le chapitre suivant. Nous présentons ici, dans un premier temps, les raisons qui encouragent l'association de ces méthodes avec la microbiologie, puis nous détaillons quelques exemples d'applications réussies. Enfin, nous présentons plus particulièrement les outils et méthodes de suivi de culture haut-débit.

1.3.1 La pertinence des outils miniaturisés pour la microbiologie

Les techniques classiquement utilisées en microbiologie permettent d'observer le comportement d'une population de microorganismes dans un environnement donné. Cela signifie que tout résultat est en fait une moyenne du comportement de chaque individu constituant la population. Dans certains cas cela s'avère parfaitement adapté, voire même avantageux car on obtient un résultat statistique sur une seule expérience. En revanche, ces méthodes ne permettent pas d'identifier les différences individuelles de réponse des microorganismes, ni de savoir si le comportement moyennement observé est dépendant ou non de la présence de toute une population (c'est-à-dire à savoir si un microorganisme seul dans les mêmes conditions aurait le même comportement) [41]. En donnant accès à des échelles proches de la taille des cellules (Figure 1.8), les techniques de miniaturisation ouvrent la voie aux études de comportements individuels[42–45]. En biologie cellulaire, l'analyse du contenu d'une cellule requiert la capacité à manipuler de très faibles volumes et à en obtenir des mesures fiables de composition. L'écoulement et l'analyse *in-situ* de fluides à l'échelle micrométrique rendus possible par la microfluidique offrent un horizon de nouvelles techniques pour ce type d'études[46, 47].

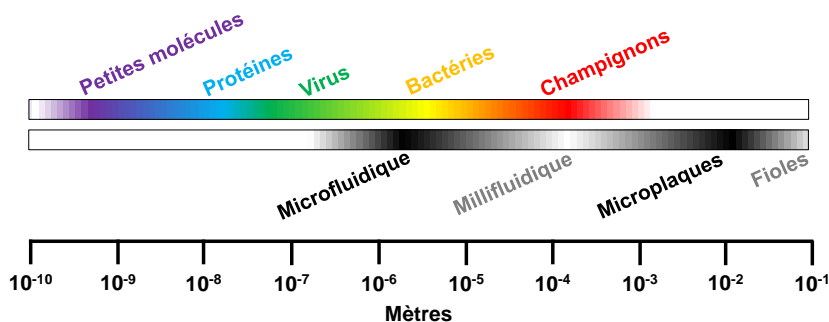


FIGURE 1.8: Schéma mettant en avant la concordance de tailles entre les outils miniaturisés et les microorganismes.

Enfin, la répétabilité des méthodes miniaturisées autorise la manipulation d'un très grand nombre d'échantillons. La formation de gouttes d'un fluide d'intérêt dans un second fluide porteur non miscible permet par exemple la génération continue d'échantillons parfaitement identiques du fluide d'intérêt. Il est possible de générer de quelques gouttes (millifluidique) à quelques milliers de gouttes

(microfluidique) par seconde, toutes parfaitement identiques. En couplant des dispositifs adaptés en amont de la génération de gouttes il est aussi possible de créer des gradients de composition entre gouttes successives sans réduire la vitesse de production des gouttes. On peut donc facilement envisager la production de très grandes quantités de mini-incubateurs aux compositions choisies à des fins de criblage, ou d'étude statistique haut-débit[48]. En choisissant convenablement les conditions opératoires, on peut également accéder à des études haut-débit de comportement d'individus isolés.

Le fort potentiel de ces techniques pour la microbiologie a d'ores et déjà donné lieu à nombre de travaux. Nous en présentons quelques-uns dans la sous-partie suivante.

1.3.2 Exemples d'applications existantes

L'association des outils miniaturisés et de la microbiologie se fait assez naturellement, pour les raisons décrites précédemment. Il est donc naturel que depuis le début de l'essor de la miniaturisation, de nouvelles techniques aient vu le jour, combinant ces deux domaines. Nous présentons ici quelques techniques exploitant, soit l'accès facilité à l'échelle cellulaire, telles que les puces à ADN ou les études de cellules uniques, soit la répétabilité et la manipulation de grands nombres d'échantillons, tels que les chemostats miniaturisés.

1.3.2.1 Les puces à ADN

Les puces à ADN (Acide DésoxyriboNucléique) permettent la détection de séquences de nucléotides (des gènes par exemple) à partir de très faibles quantités d'échantillons. Nous introduisons en premier lieu cette technique de biologie cellulaire car elle fut l'une des premières à se développer avec l'arrivée des outils miniaturisés[49, 50] mais aussi car elle a constituée un réel moteur pour le couplage de la miniaturisation avec le monde biologique et microbiologique. Les puces à ADN sont devenues des outils disponibles commercialement depuis.

Typiquement, une puce est composée d'une surface (souvent du verre) qui sert de support pour fixer des sites d'hybridation. C'est-à-dire que la surface est recouverte par des zones supportant des fragments d'ADN sélectionnés pour s'hybrider avec les fragments à détecter. En pratique, il existe plusieurs techniques

pour mettre en place ces "points d'accroches", parmi lesquelles on peut citer la synthèse *in-situ* des oligonucléotides d'ADN par photolithographie ou la dépose robotisée des fragments[51]. Il est ainsi possible de générer plusieurs milliers de sites d'hybridation sur quelques centimètres carrés de verre, tous identiques ou bien présentant des affinités spécifiques à différents gènes à détecter. Ensuite, les fragments d'ADN ou protéines à détecter sont mis en contact avec des marqueurs fluorescents spécifiques destinés à s'hybrider avec les fragments cibles, les rendant ainsi fluorescents. Enfin l'échantillon peut être mis en contact avec la surface (par écoulement microfluidique, déposition manuelle ou robotisée, ...). Le couplage des gènes visés sur les sites d'hybridation va permettre leur concentration sur la surface réduite de la puce et rendre possible la détection du ou des marqueurs fluorescents par microscopie. La Figure 1.9 représente le principe de fonctionnement des puces, ainsi qu'un exemple de résultat obtenu sur une puce juxtaposant divers types de fragments d'accroche.

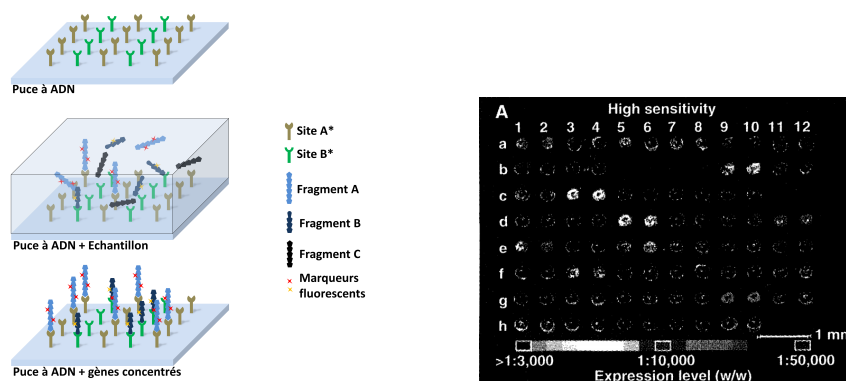


FIGURE 1.9: Schéma de principe du fonctionnement d'une puce à ADN. Les sites d'hybridation A* et B* complémentaires respectivement des fragments A et B fixés sur la surface concentrent les gènes d'intérêt sans retenir les autres permettant une forte concentration locale des fragments d'intérêt marqués par des molécules fluorescents. À droite, exemple de résultat reproduit à partir de la référence *Schena et al*[49].

L'optimisation de cette méthodologie de base par pré-purification de l'échantillon, amplification de signal, ou autre, fait des puces à ADN un outil puissant de cartographie de génome, détection de polymorphisme de gènes[52], etc... Les applications de cet outil sont multiples et touchent des domaines de recherche fondamentale tel que la régulation des gènes[53], comme des domaines d'intérêt médical pour détecter et comprendre les maladies et leurs évolutions[54], ou encore le domaine industriel et notamment agroindustriel[55].

1.3.2.2 L'étude de cellules uniques

Les méthodes microbiologiques connues et utilisées couramment depuis plusieurs décennies ne permettent pas d'isoler précisément et de suivre la croissance ou le métabolisme d'une cellule isolée. Des méthodes telles que l'étalement sur boîte de Pétri permettent la séparation des individus issus d'une population mais ne donnent pas de renseignements directs. La possibilité de contrôler des écoulements et des flux (substrats, gaz, ...) à des échelles micrométriques rend possible l'accès à ce type d'informations. Les travaux couplant la microbiologie à la miniaturisation ont en effet permis le développement de techniques permettant la manipulation, l'isolement, la culture et l'analyse *in-situ* de cellules[56–59].

Les principaux champs d'application des méthodes d'isolement de cellules uniques sont l'étude de microorganismes non cultivables en laboratoire[60], l'évaluation de la physiologie des cellules[61] et enfin la recherche de nouveaux produits métaboliques d'intérêt tels que les enzymes ou les antibiotiques[42]. Les méthodes qui rendent possible la réalisation de ce genre d'études sont nombreuses et l'objectif ici n'est pas de les lister toutes. Pour illustrer le potentiel d'étude de cellules isolées en microfluidiques nous pouvons évoquer le "tri de cellule activé par fluorescence" (FACS) et l'évaluation de l'impact d'un stimulus mécanique sur des cellules adhérentes[62].

Le FACS ("Fluorescence-Activated Cell Sorting") est une méthode proche de la cytométrie en flux. Une suspension de microorganismes à trier est injectée dans un canal miniaturisé où l'utilisation d'une dilution adaptée et les effets hydrodynamiques du confinement entraînent la formation d'un alignement des cellules. La fragmentation du train de cellules en gouttes renfermant un unique individu par co-écoulement d'un fluide porteur non-miscible permet de les isoler en séparant les gouttes. Le train de gouttes ainsi formé passe au travers du rayon d'un laser, et l'analyse instantanée de la lumière diffusée permet la différenciation des cellules (par exemple, il est facile de distinguer une cellule produisant une protéine fluorescente d'une cellule n'en produisant pas). Cette différenciation déclenche ensuite l'activation d'un système (électrodes par exemple), qui oriente les gouttes pour séparer les réponses positives des négatives. Encore une fois, les méthodes de tri de gouttes sont nombreuses, et nous ne citerons ici que la technique consistant à attribuer une charge à la goutte en la soumettant à un léger champ électrique, puis à la diriger à l'aide d'électrodes. La Figure 1.10 schématise la technique décrite

ci-dessus.

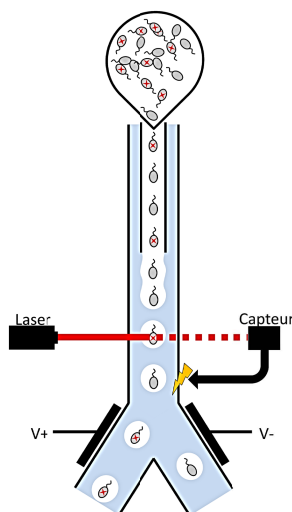


FIGURE 1.10: Schéma de principe du fonctionnement du FACS.

Un autre exemple d'application de techniques miniaturisée à l'étude de cellules uniques est décrit par *Tan et al*[62]. La Figure 1.11 représente le schéma de principe ainsi qu'une image d'expérience obtenue lors de l'étude d'interactions mécaniques entre les cellules et leur support. Les techniques de microfabrication et de caractérisation optique rendent possible le calcul des efforts exercés par les cellules sur les piliers de support. Ils parviennent ainsi à démontrer la coordination de signaux biochimiques et biomécaniques pour la régulation de l'adhésion et de la mécanique des cellules. Cette réalisation donne un exemple du potentiel d'informations, de niveau cellulaire, auquel la miniaturisation donne accès.

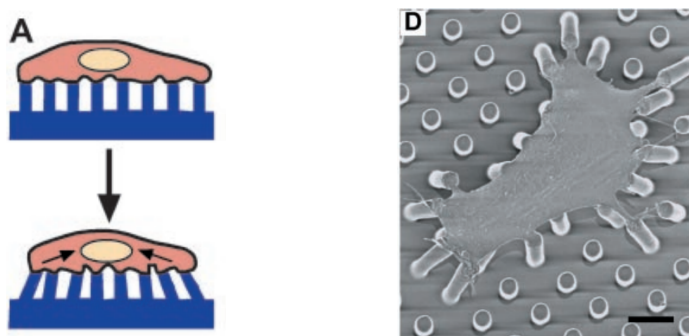


FIGURE 1.11: Schéma de principe du fonctionnement de du dispositif développé par *Tan et al*. (Reproduit à partir de *Tan et al*[62])

1.3.2.3 Les chemostats miniaturisés

La composition du milieu de culture influe directement sur la croissance des microorganismes. En culture fermée, dite "batch", cette composition est fixée au démarrage de la culture et évolue ensuite avec la consommation et les rejets des cellules. Ainsi, il n'est pas possible de contrôler la composition du milieu dans ce type de systèmes. Pour y parvenir, des bioréacteurs fonctionnant en continu, appelés chemostats ont été développés. Ils sont constitués d'un bioréacteur classique, auquel sont ajoutées des entrées et sorties. La composition et le débit des entrées et sorties sont régulés avec précision. La composition des sorties peut être identique à celle de la culture, ou bien ne contenir que le milieu liquide si elles sont équipées d'un filtre maintenant les microorganismes dans le réacteur. Le pilotage de ces entrées/sorties autorise un contrôle instantané de la composition tout au long de la culture.

L'utilisation de chemostats est maintenant largement répandue et s'applique à de nombreux domaines[63–65]. En effet, le contrôle du milieu au cours du temps permet un contrôle de la croissance qui peut être utilisé pour optimiser la production d'un métabolite d'intérêt, pour produire de grandes quantités de biomasse, pour faire croître des microorganismes difficilement cultivables, etc...

Cependant, la gestion des flux peut être complexe, nécessite des équipements coûteux et l'injection continue de produit entraîne des consommations élevées. Ainsi, à des fins de recherche, ou dans les phases de développement de bioprocédés, la miniaturisation de tels équipements représente un réel enjeu. Des dispositifs tels que les puces microfluidiques y répondent puisqu'elles offrent une grande flexibilité de conception et d'intégration qui donnent la possibilité de gérer plusieurs écoulements indépendants à l'aide de vannes, de les rassembler à l'aide de micro-mélangeurs, de les stopper dans des chambres (Figure 1.12). De plus, la transparence de ces dispositifs autorise le suivi *in-situ* de la culture par couplage avec diverses méthodes optiques.

De nombreux travaux ont permis de concevoir des dispositifs plus ou moins complexes, et autorisant le contrôle de plus ou moins de paramètres, selon les applications recherchées. Ainsi, *Balagaddé et al.* [66] ont développé une puce microfluidique supportant six microchemostats en parallèle. Chacun d'entre eux consiste en une boucle de croissance où la culture se développe et peut être agitée,

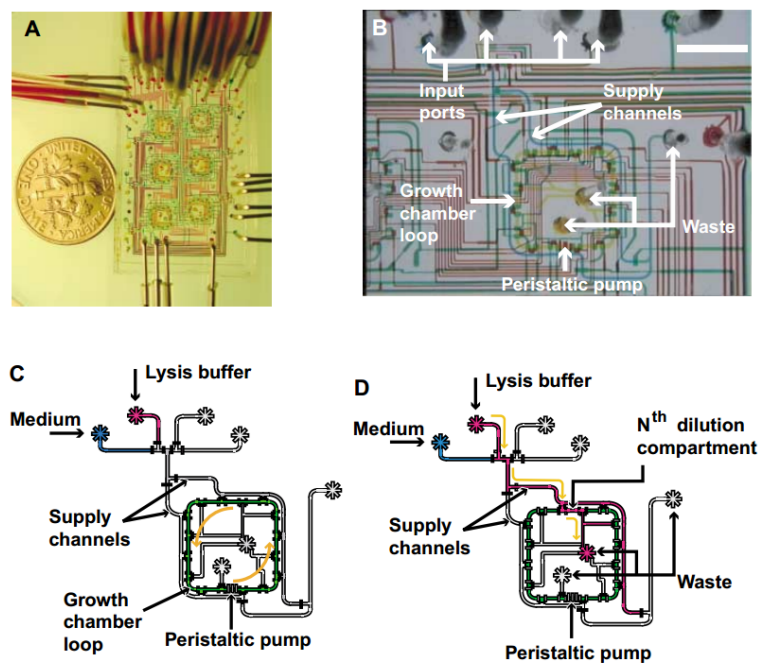


FIGURE 1.12: Schéma de principe du fonctionnement du dispositif développé par *Balagaddé et al.* (Reproduit à partir de *Balagaddé et al* [66])

reliée à deux canaux d'apport de milieu frais, et trois canaux de prélèvements. Le suivi optique de population en ligne leur permet d'étudier le comportement dynamique d'une population d'*Escherichia coli* en vue du contrôle de la formation de biofilm. D'autres dispositifs[67, 68] permettent également un contrôle des échanges gazeux, de la température, etc. . .

Un autre type d'application des outils miniaturisés en microbiologie qui focalise beaucoup d'attention est le suivi de culture haut-débit. Les techniques existantes à l'heure actuelle dans ce domaine représentent la base à partir de laquelle ce travail de thèse a été réalisé. Ces techniques sont explicitées dans la sous-section suivante.

1.3.3 Le suivi de croissance haut-débit

La réalisation de suivis microbiologiques en grand nombre pour atteindre le haut-débit peut difficilement être envisagée sans réduction des volumes de culture par rapport aux erlenmeyers ou fioles utilisés habituellement. C'est pour cela que les dispositifs de criblage microbiologique ont pu se développer à partir du moment où les techniques de miniaturisation sont apparues. Cela a débuté par la mise en

oeuvre de volumes intermédiaires où la manipulation reste aisée sans équipement particulier, puis a évolué vers des volumes de plus en plus faibles nécessitant des technologies plus récentes mais autorisant également une augmentation de la capacité de parallélisation. Cette évolution des techniques se retrouve traduite par la maturité des dispositifs associés. En effet, les systèmes commerciaux que nous décrivons ici en premier lieu ont des capacités de gestion de volumes de l'ordre de 0.1 à 1 mL, alors que certains dispositifs à l'étape de validation à l'échelle du laboratoire travaillent avec des volumes compris entre 1 et 100 μL , et que des innovations récentes offrent la possibilité de manipuler des incubateurs de volume inférieurs au μL .

1.3.3.1 Les systèmes disponibles commercialement

Le suivi de croissance de microorganismes fait appel à plusieurs étapes, décrites dans la première partie de ce chapitre. L'optimisation de ce suivi doit donc passer par une amélioration de chacune de ces étapes. Ainsi, nous décrivons ici seulement des dispositifs complets, sans détailler les produits tels que les microplaques qui, utilisés indépendamment, n'améliorent pas plus d'une étape des méthodes classiques.

Le premier exemple de dispositif commercial que nous citons est le "MBECTM HTP assay", développé par la société INNOVOTECH (<http://www.innovotech.ca/>). L'objectif de ce système est de proposer un ensemble d'outils et de méthodes optimisés pour le test d'efficacité d'agents antimicrobiens sur les biofilms. On rappelle que l'on qualifie de biofilm une population de microorganismes irréversiblement attachés à une surface sur laquelle elle se développe selon des processus physiologiques bien distincts de populations planctoniques. Le principe de fonctionnement de la méthode est le suivant:

- Croissance des microorganismes désirés
Une ou des souches cryogénisées du microorganisme d'étude sont précultivées afin de s'assurer de leur bon état de conservation.
- Inoculation du système MBECTM
La préculture est inoculée dans un milieu frais et répartie dans les puits

d'une microplaque 96 puits spécialement conçue. La partie supérieure (couverture) de la microplaque est en effet recouverte de 96 pics de polystyrène qui plongent chacun dans un puits lorsque la microplaque est fermée. Ces pics servent de support pour le développement des biofilms. Après inoculation, la microplaque est incubée sous agitation pendant la durée souhaitée afin de laisser les biofilms se développer.

- Exposition des biofilms à l'agent anti-microbien

Une nouvelle microplaque est préparée avec une solution d'antimicrobien, distribué à différentes concentrations dans chaque puits (gradients réalisés rapidement à l'aide de pipettes multicanaux). Les pics supportant les biofilms formés à l'étape précédente sont alors retirés de leur microplaque de croissance et plongés dans le milieu avec antimicrobien comme représenté sur la Figure 1.13. Les biofilms sont incubés au contact de l'agent antimicrobien pendant une période d'exposition choisie.

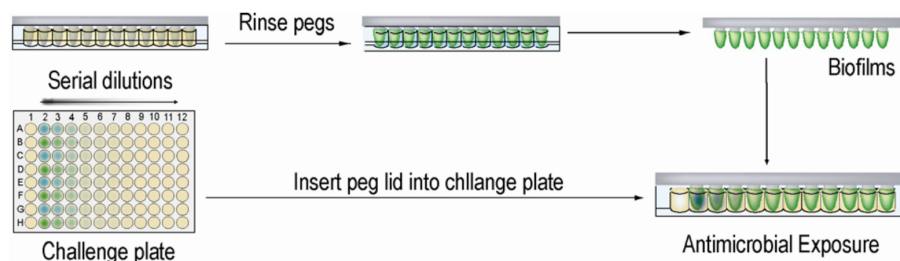


FIGURE 1.13: Système MBEC^(R) commercialisé par INNOVOTECH. (<http://www.innovotech.ca>)

- Neutralisation de l'agent et récupération des biofilms

Une fois le temps d'exposition écoulé, les biofilms sont rincés dans un agent neutralisant par déplacement du couvercle MBECTM dans une microplaque contenant la solution neutralisante. Ils sont ensuite à nouveau déplacés dans une microplaque propre avec la même solution neutralisante que la précédente, et soumis aux ultrasons afin de détacher le biofilm des pics de polystyrène. Le couvercle avec pics est jeté une fois que les biofilms sont repassés en solution dans les puits.

- Mesure d'efficacité de l'agent anti-microbien

Les microorganismes remis en suspensions peuvent ensuite être dénombrés par dilutions successives et étalements sur boîte de Pétri, mais on perd dans

ce cas l'intérêt du haut-débit. Leur nombre peut également être estimé par mesure de densité optique. Les populations mesurées pour chaque puits permettent ainsi de déterminer la concentration en agent à partir de laquelle un effet anti-microbien est observé.

Bien qu'utilisable uniquement dans le cas de croissance sous forme biofilm et non planctonique comme dans notre cas, cet exemple illustre comment la réduction de taille permet de paralléliser des tests dont la durée est incompressible. De plus, le protocole décrit ci-dessus peut être adapté et/ou complété de façon à obtenir des données différentes qu'une concentration minimale d'efficacité. En effet, des analyses périodiques peuvent donner accès à un suivi dans le temps, l'observation sous microscope des biofilms peut renseigner sur leurs structures, etc. . .

Le second exemple de système de suivi microbiologique haut-débit détaillé dans cette partie est en fait un ensemble d'outils optimisés proposés par la société THERMO SCIENTIFIC. Les milieux, microplaques, pipettes multicanaux, lecteurs fluorométriques ou optiques développés sous le nom commun "SensititreTM" peuvent être combinés manuellement ou de façon automatisée afin de réaliser des suivis de croissance de microorganismes en suspension et/ou des tests de susceptibilité aux antibiotiques. La préparation des cultures est facilitée par les pipettes multicanaux autorisant une haute parallélisation en microplaque classique, ou en microplaque "SensititreTM" pré-remplie par des marqueurs d'activité cellulaire ou par des agents anti-microbiens (gradient de concentration à travers la microplaque pour détermination de concentrations minimales d'efficacité). L'évolution de population se fait alors, en suspension, directement dans les micropuits. Les systèmes de lecture spécialement prévus pour accueillir ces microplaques permettent une mesure du signal fluorométrique ou bien l'acquisition d'images de façon rapide sur chaque puits. Ces instruments utilisés tels quels donnent accès à une capacité de test accrue par rapport aux méthodes classiques, mais conservent toutefois plusieurs opérations manuelles de durée importante. Pour pallier à cela, THERMO SCIENTIFIC a également développé des appareils capables de procéder aux inoculations d'une part, le "SensititreTM AIMTM Automated Inoculation Delivery System", et d'incuber et lire automatiquement les microplaques d'autre part, le "SensititreTM ARISTM ID/AST System" (Figure 1.14).

Le nombre de systèmes commerciaux pour l'optimisation d'études microbiologiques ne s'arrête évidemment pas à trois, mais cette section ayant uniquement



FIGURE 1.14: Système ARIS 2X^(R) commercialisé par la société THERMO SCIENTIFIC. (<http://www.thermoscientific.com/>)

pour but d'illustrer le panel de techniques existantes, nous ne présentons ici qu'un seul outil supplémentaire. Il s'agit du TEMPOTM, produit par la compagnie BIOMERIEUX INDUSTRY.

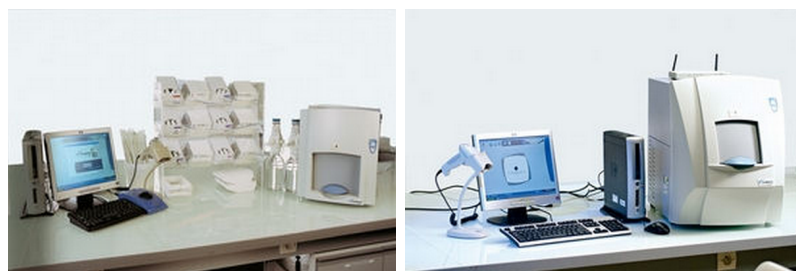


FIGURE 1.15: Système TEMPO^(R) commercialisé par la société BIOMERIEUX. (<http://www.biomerieux.fr/>)

Ce système présenté sur la Figure 1.15 permet de mesurer la population après croissance de façon entièrement automatisée. Les milieux de croissance sont disponibles à l'achat avec, pour chacun, un milieu adapté à un type de test. C'est-à-dire que le milieu en question contient les marqueurs cellulaires et les nutriments spécifiques aux microorganismes à tester de façon à permettre leur croissance et leur dénombrement. Les échantillons à tester sont mélangés aux réactifs adaptés dans un sac stérile, puis transférés de façon autonome dans une carte de croissance et dénombrement. L'innovation majeure de ce système repose dans cette carte (Figure 1.16).



FIGURE 1.16: Carte d'analyse du système TEMPO^(R).

L'échantillon se répartit dans 16 tubes de différentes dilutions, où il croît ensuite pendant la période d'incubation. A la fin de cette période, la fluorescence est mesurée dans chaque tube : elle est présente dans les tubes où il y a eu croissance, absente ailleurs. Grâce à la méthode dite du nombre le plus probable (MPN), ces informations permettent d'obtenir la population qui était présente dans l'échantillon initial.

Cet outil automatise donc entièrement la phase de dénombrement d'un suivi de population et peut ainsi s'appliquer à des études d'évaluation de contamination microbienne dans des échantillons donnés. Mais il s'applique également au dénombrement de populations issues d'autres types d'échantillons, tels que des cultures de microorganismes choisis en présence d'agent anti-microbiens. Le système BACTECTM (Figure 1.17) développé par BECTON DICKINSON présente des capacités du même type.



FIGURE 1.17: Système BACTEC^(R) commercialisé par la société BECTON DICKINSON. (<http://www.bd.com>)

L'ensemble de ces systèmes propose des volumes de travail déjà inférieurs à la plupart des méthodes classiques, mais tout en restant supérieur ou égal à l'ordre du

millilitre. Le gain de temps qu'ils engendrent vient donc d'une parallélisation satisfaisante, mais surtout de l'automatisation et/ou simplification des étapes. Toutefois, la parallélisation de cultures de l'ordre du millilitre implique un encombrement non négligeable. Très performants pour bon nombre d'opérations et tests de routine des laboratoires de microbiologie, ces systèmes montrent des limites pour des criblages précis sur de très grands nombres d'échantillons. Pour les dépasser, il faut tendre à optimiser, ou du moins à conserver, la précision des résultats, tout en atteignant des degrés de parallélisation supérieurs avec des encombrements équivalents ou inférieurs. Cela passe obligatoirement par une réduction d'échelle des cultures. Des outils répondant de façon plus ou moins complète à ces critères sont décrits dans la sous-section suivante, en commençant par les projets les plus aboutis, puis en terminant par les résultats récents et prometteurs.

1.3.3.2 Les dispositifs validés à l'échelle du laboratoire

Les méthodes de manipulation de volumes de fluides inférieurs au millilitre se résument principalement aux techniques millifluidique et microfluidique. Certains outils ont déjà montré leur potentiel à l'échelle du laboratoire, nous en présentons ici quelques exemples.

Dans l'optique d'un suivi de croissance haut-débit, *Baraban et al*[1] (Figure 1.18) ont développé un analyseur de gouttes millifluidiques pour la microbiologie. Le principe de l'outil est la génération rapide de gouttes contenant un ou plusieurs microorganismes, du milieu de culture, et un antibiotique. La concentration en antibiotique est sensiblement différente d'une goutte à l'autre, ce qui crée un gradient d'antibiotique le long du train de gouttes dans son ensemble. Après génération, le train de gouttes circule en permanence d'avant en arrière de façon à ce que chaque goutte passe à intervalle de temps régulier devant un détecteur. Le système de détection est un objectif couplé à un tube photomultiplicateur et un détecteur qui mesure la fluorescence issue de chaque goutte. Les microorganismes choisis sont porteurs de l'allèle YFP ("Yellow Fluorescent Protein") du gène GFP ("Green Fluorescent Protein"), et génèrent donc des protéines fluorescentes au cours de leurs processus métaboliques. La fluorescence émise dépend du nombre de microorganismes et permet donc de suivre l'évolution de population dans chaque goutte (Figure 1.18).

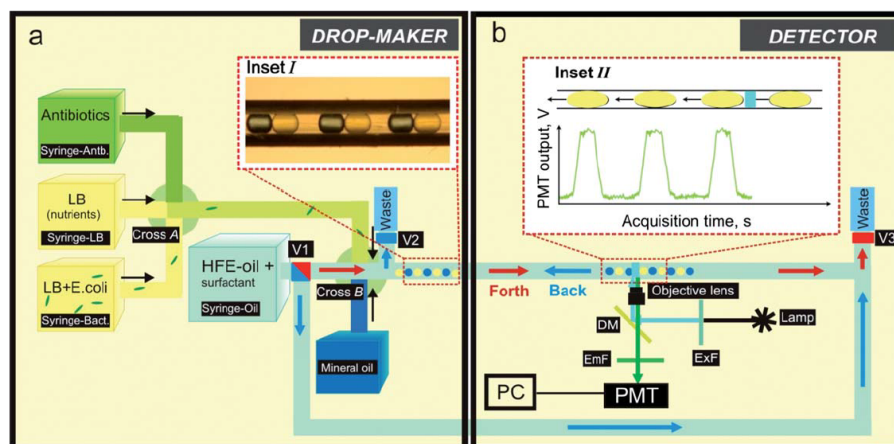


FIGURE 1.18: Analyseur millifluidique à gouttes pour la microbiologie. (Reproduit à partir de la référence *Baraban et al*[1])

Le suivi de croissance d'une série de gouttes contenant un gradient de concentration en antibiotique est représenté sur la Figure 1.19, issue de l'article de *Baraban et al*[1]. On note toutefois une gamme de linéarité entre la population et la fluorescence des bactéries qui se limite à une décade. Sachant que certains tests réglementés nécessitent la quantification de populations sur plusieurs ordres de grandeur, il est important de souligner ce point. Par ailleurs, un facteur 3 sépare les concentrations minimales d'efficacité déterminée par l'outil millifluidique et celles mesurées en microplaques. Au delà des éventuelles erreurs liés aux méthodes de mesure, cette observation soulève la question de l'impact de la réduction d'échelle sur la croissance et du comportement des microorganismes face à un agent anti-microbien. Ces problématiques font partie des motivations de ce travail de thèse et seront donc discutées dans la suite de ce manuscrit.

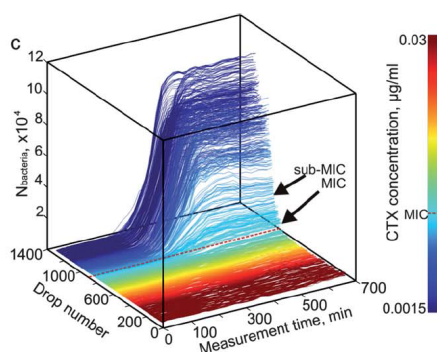


FIGURE 1.19: Résultats obtenus par l'Analyseur millifluidique à gouttes pour la microbiologie. (Reproduit à partir de la référence *Baraban et al*[1])

Ces limitations n'apparaissent cependant que pour certaines applications. Cela ne bloque donc pas les performances de l'outil qui est par exemple utilisé par *Cottinet*[69] à des fins d'études phénotypiques. Le principe simplifié de l'étude est d'utiliser l'analyseur de gouttes millifluidiques pour encapsuler dans chaque goutte des cellules uniques issues d'une population préalablement soumise à un stress. Ainsi, l'évolution de population dans chaque goutte traduit le phénotype de la cellule initialement encapsulée. Par comparaison des répartitions phénotypiques observées suite à diverses expositions (à des antibiotiques par exemple), *Cottinet* déduit des "lois" de réponse du microorganisme d'étude vis-à-vis du stress imposé.

A l'échelle inférieure, c'est-à-dire en microfluidique, nous évoquons tout d'abord un dispositif original par sa simplicité qui permet d'effectuer une évaluation de concentration minimale d'efficacité d'antibiotiques. Mis au point par *Cira et al*[2], l'outil illustré dans la Figure 1.20 conserve des étapes manuelles mais qui restent rapides grâce à leur simplicité. Il permet de profiter de la réduction d'échelle pour paralléliser les tests, et d'être capable de réaliser de nombreuses séries de tests simultanés pour un encombrement réduit. La mesure effectuée par colorimétrie est certes moins précise que dans le cas de dénombrement de populations, mais le système n'en reste pas moins notable du fait de la facilité d'utilisation par rapport aux autres techniques existantes à cette échelle.

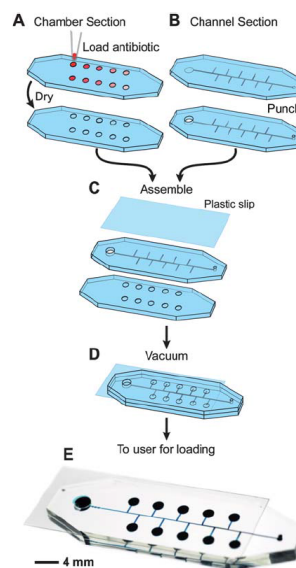


FIGURE 1.20: Dispositif développé par *Cira et al.* (Reproduit à partir de la référence *Cira et al*[2])

Le dispositif suivant que nous souhaitons évoquer dans cette partie allie un fonctionnement simple, proche du système de *Cira et al*, à une méthode de dénombrement plus complexe, mais quantitative. La puce microfluidique développée par *Takagi et al*[3] se compose de sept chambres d'incubations distinctes, dans lesquelles une matrice lyophilisée contenant le ou les composés à tester peut être déposée. Le remplissage de la puce par une suspension de microorganismes s'effectue par des canaux latéraux connectés à chaque chambre. Une fois remplies, les chambres sont isolées par retrait de la suspension des canaux latéraux. Les forces capillaires piègent le milieu de culture dans chaque chambre. L'ensemble de la puce (10mm x 32mm) peut ensuite être incubé. Pour mesurer l'impact des composés sur la croissance des microorganismes, le suivi de population au cours du temps est assuré par acquisition régulière d'images des chambres par microscopie confocale à réflexion. Il est important de noter qu'en absence d'agitation, les populations dénombrées peuvent se développer sous forme de biofilm sur la surface inférieure de la puce. La Figure 1.21 présente un schéma du montage ainsi que des exemples d'images acquises soit dans une chambre à différents moments de la croissance, soit après 12h de croissance dans des chambres contenant des concentrations croissantes en antibiotique.

Enfin, nous citons en dernier lieu le système microfluidique de *Tang et al*[70]. Il permet de quantifier l'impact du pH, et de la composition du milieu d'une part, et celui de la température d'autre part, grâce à une seconde puce microfluidique adaptée. La conception du système rend possible la génération *in situ* de gradients de concentrations (en milieu nutritif, mais on imagine facilement l'extension pour le test d'agents anti-microbiens) et l'incubation simultanée dans dix boucles d'incubation parallèles sur une surface de l'ordre du centimètre carré. Des vannes pneumatiques microfluidiques autorisent la mise en écoulement de la suspension contenue dans chaque boucle, sans y ajouter ou retirer de liquide. Ainsi, les dénombrements de population effectués par acquisition d'images sous microscope correspondent à des populations en suspension, l'écoulement évitant la formation de biofilms. La conception des puces est rappelée sur la Figure 1.22. Les résultats obtenus dans ces dispositifs montrent des vitesses de croissance des microorganismes bien plus élevées que dans des dispositifs classiques de type fioles ou erlenmeyer. On remarque donc ici encore, comme dans les travaux de *Baraban et al*, que la réduction de la taille des incubateurs n'est pas sans effet sur les microorganismes et qu'il paraît nécessaire de comprendre ces effets afin de valider

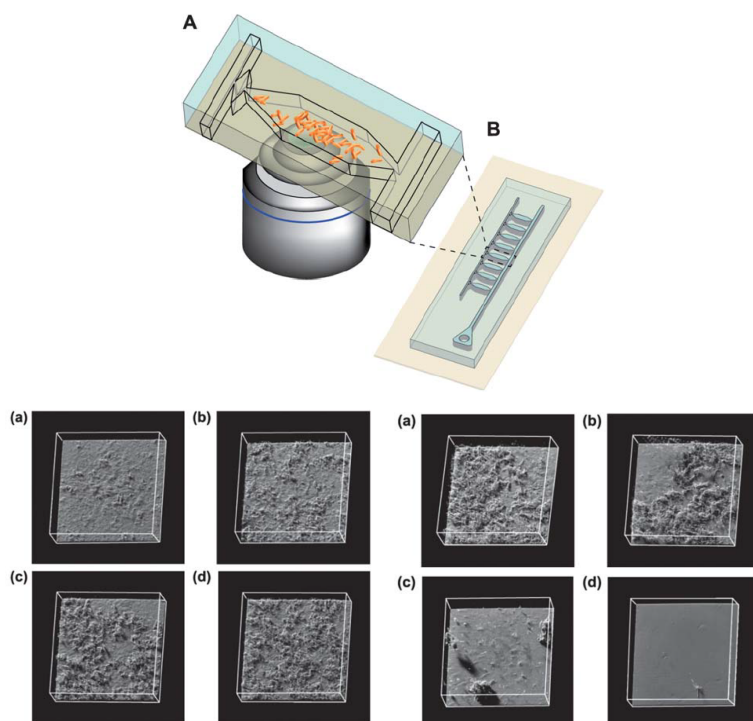


FIGURE 1.21: Dispositif développé par *Takagi et al* (en haut), et exemple de résultats obtenus du suivi de développement de biofilms (Reproduit à partir de la référence *Takagi et al*[3]).

les résultats obtenus à échelle réduite vis-à-vis des études classiques.

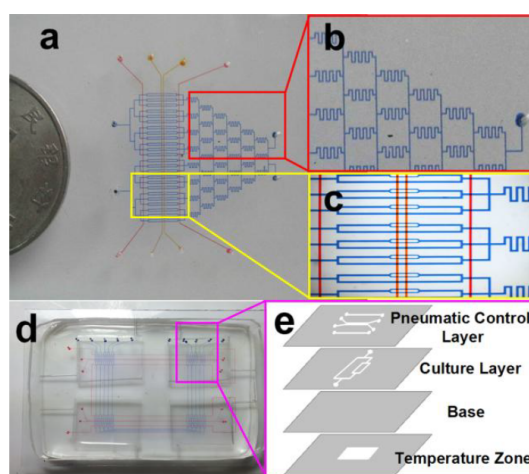


FIGURE 1.22: Dispositif microfluidique pour criblage de conditions de culture développé par *Tang et al*. (Reproduit à partir de la référence *Tang et al*[70])

Ces outils et techniques montrent à quel point le suivi de croissance de microorganismes pour l'évaluation d'agents anti-microbiens est actif. Ils indiquent

probablement que les systèmes commerciaux décrits dans la sous-partie précédente devraient rapidement voir arriver des systèmes concurrents encore plus miniaturisés et avec des capacités de criblage accrues. Cependant, ils ne satisfont pas encore aux critères de tous les tests pour lesquels l'accès au haut-débit serait souhaitable et les recherches qui visent à optimiser et/ou élargir l'applicabilité de ces techniques sont nombreuses. La sous-partie suivante présente quelques exemples d'innovations entrants dans ce cadre.

1.3.3.3 La poursuite de la miniaturisation et ses limites

Dans la suite logique des développements techniques décrits précédemment et visant à accroître encore la capacité de tests, on peut noter la recherche de méthodes de cultures de plus en plus parallélisées. *Ingham et al*[71] proposent en 2007 une puce microfluidique composée d'un million de puits de culture indépendants. Cette réalisation (la "Micro-Petri chip") est citée en tant qu'illustration d'une loi de Moore microbiologique (Figure 1.23), par *Gefen et al*[4]. Ces derniers mettent en évidence une capacité de gestion de volumes de culture de plus en plus petits et nombreux depuis l'apparition des microplaques dans les années 90.

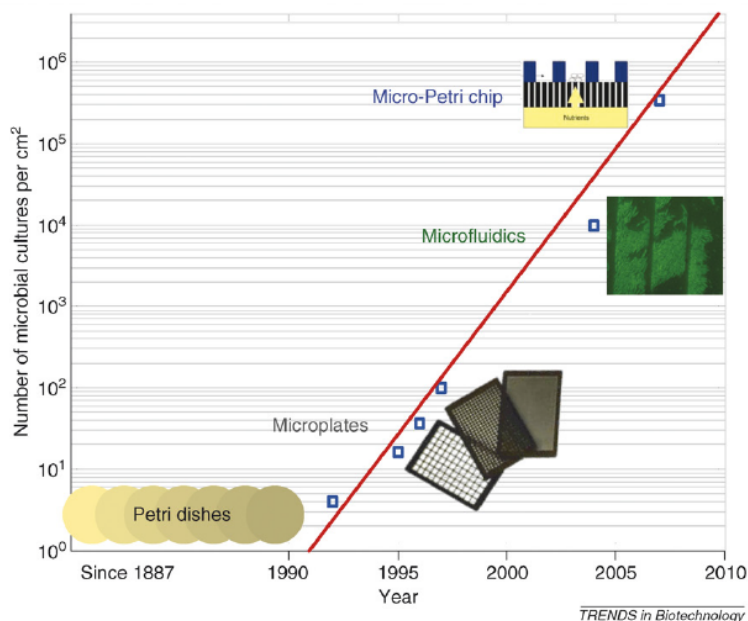


FIGURE 1.23: Loi de Moore microbiologique proposée par *Gefen et al.* (Reproduit à partir de la référence *Gefen et al*[4]).

Toutefois, il faut noter que les puits conçus par *Ingham et al* ne peuvent accueillir que quelques cellules du fait de leur taille. Cela signifie que l'on atteint

avec ces derniers travaux une limite en terme de réduction de l'échelle de culture. La loi de Moore microbiologique atteint donc d'ores et déjà sa limite inférieure avec des incubateurs dont la taille est du même ordre que celle d'une cellule. Cela soulève d'ailleurs une interrogation quand à la possibilité pour un microorganisme de se développer dans des conditions si confinées. L'effet de la réduction de taille des incubateurs sur la croissance des microorganismes semble donc être un effet primordial à étudier pour valider les résultats obtenus à échelle réduite vis-à-vis de ceux obtenus à échelle classique. Nous nous intéressons en détail à cette problématique dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

1.4 Motivations et objectifs du travail de thèse

Dans la première moitié de ce chapitre, nous nous sommes attachés à présenter les méthodes qui ont été développées au cours des derniers siècles et qui ont fait leurs preuves pour l'étude des microorganismes. Ces méthodes permettent d'une part le développement choisi et contrôlé de populations de microorganismes en apportant aux cellules les nutriments dont ils ont besoin dans des conditions favorables. D'autre part, elles offrent la possibilité d'estimer la quantité d'organismes qui constituent les populations, donnant ainsi accès à des données quantifiées qui peuvent être comparées entre elles. Toutefois, elles ne sont pas universelles et présentent pour chacune des inconvénients qui les rendent inutilisables dans certains cas. Malgré cela, elles ont permis des avancées considérables en termes de connaissance des microorganismes, et ont amenés les industriels à s'y intéresser. Les raisons qui poussent le milieu industriel à se pencher sur la microbiologie sont en partie décrites dans la deuxième partie de ce chapitre. Ces motivations sont nombreuses et variées, de la conservation de produits à la production de molécules, mais se trouvent bien souvent limitées, ou du moins ralenties, par les capacités des méthodes traditionnelles. Pour répondre, entre autres, à ce besoin, de nombreux efforts sont faits en direction de la mise au point de nouvelles méthodes plus efficaces. L'utilisation de techniques de miniaturisation en microbiologie est un domaine très actif de la recherche actuelle. Nous avons présenté le potentiel de cette combinaison dans la dernière partie de ce chapitre. L'association de ces deux domaines se justifie facilement par un accord de taille qui ouvre la porte à des manipulations impossibles autrement. Le succès de ces recherches a été illustré par quelques exemples, en terminant par le développement d'outils de suivi

de croissance haut-débit qui constitue l'axe principal de ce travail de thèse. La recherche et caractérisation d'agents anti-microbiens pour la protection microbiologique de produits industriels représente un volume important d'études pour l'équipe de microbiologistes de Solvay. En collaboration avec cette équipe, nous avons fixé l'objectif commun de mettre au point un outil qui puisse optimiser les tests d'efficacité de biocides qui sont actuellement réalisés de façon routinière par des méthodes classiques.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs problématiques doivent être explorées. Tout d'abord, il est nécessaire de se demander quel type d'outil est le plus performant pour mettre au point un dispositif simple et flexible d'utilisation pour ces tests. Le choix doit ensuite être fait entre les systèmes continus de type chemostats et les systèmes statiques pour réaliser des suivis de culture sur plusieurs jours. Enfin, il est également primordial de déterminer l'impact de la modification de l'incubateur, notamment de sa taille, sur la croissance des microorganismes.

La suite de ce manuscrit présente les réponses apportées à ces problématiques, et est organisée de la façon suivante: en premier lieu, nous présentons les méthodes analytiques innovantes testées pour le suivi de microorganismes et les outils milifluidiques et microfluidiques adaptés à la croissance. Ensuite, nous détaillons les observations expérimentales de cultures réalisées à travers une gamme de tailles d'incubateurs et présentons un modèle numérique permettant d'identifier et d'estimer les paramètres clés. Enfin, nous expliquons comment ces outils ont été couplés et automatisés afin d'atteindre le haut-débit. Nous concluons sur l'étude d'efficacité de deux biocides par le système automatisé, en présentant les résultats statistiques de croissance obtenus grâce à la grande quantité de données.

POINTS CLÉS DU CHAPITRE:

- La microbiologie est la science qui s'intéresse à l'étude des microorganismes. Des méthodes robustes ont été développées depuis ses débuts, permettant la culture contrôlée et le suivi d'évolution de populations microbiennes.
- Dans l'industrie, la capacité à maîtriser le développement de microorganismes est cruciale. Étant donné la diversité et la quantité de cas à maîtriser, les outils d'étude microbiologique classiques se révèlent trop peu efficaces et freinent l'innovation.
- Les outils fluidiques miniaturisés présentent un fort potentiel d'application pour des études microbiologiques. En particulier, ils permettent de paralléliser et optimiser la culture et le suivi d'évolution de populations de microorganismes.
- **L'objectif de ce travail de thèse est de développer des méthodes de culture miniaturisées et de suivi de populations optimisées, d'étudier l'impact de la réduction de l'échelle d'incubation sur la croissance des microorganismes, pour aboutir à un outil fluidique miniaturisé haut-débit pour la caractérisation de biocides.**

Chapitre 2

Techniques de mesures et incubateurs miniatures

L'intérêt des outils miniaturisés dans le domaine de la microbiologie a été exposé dans la première partie de ce manuscrit. Nous allons dans ce chapitre présenter le travail qui a été réalisé pour adapter des outils initialement développés pour la chimie à l'étude de la croissance de microorganismes. En premier lieu, nous décrivons les microorganismes choisis pour cette étude, puis nous présentons l'exploration et le développement de méthodes analytiques pour le suivi de croissance de microorganismes compatibles avec des tests haut-débit. Ensuite, nous introduirons les outils fluidiques miniaturisés et les adaptations qui ont été nécessaires afin de les utiliser comme incubateurs miniatures.

2.1 Les microorganismes d'étude

Le développement d'un système de suivi de croissance haut-débit fixé comme cible dans ce travail de thèse a pour but de permettre la détermination de concentrations minimales d'efficacité de biocides. Ces tests sont déjà effectués couramment dans de nombreux laboratoires, et imposent le choix de certains types de microorganismes. En effet, l'efficacité d'un agent anti-bactérien doit être démontrée face à des populations représentatives des contaminations auxquelles on peut avoir à faire face. Les méthodes de sélection et de caractérisation de ces agents sont détaillées dans le paragraphe [4.4.1.2](#) de ce manuscrit.

Dans le cadre du développement d'un outil haut-débit, nous avons sélectionné dans un premier temps une souche fluorescente, afin de faciliter sa détection, mais

également proche des souches qui se retrouvent dans des contaminations. Ainsi la recherche d'une méthode de suivi de population, et les tests de croissance en systèmes miniaturisés ont été effectués avec la souche *Escherichia coli* MC4100-YFP.

La fluorescence de cette bactérie est due à l'expression du gène *yfp*, qui a été inséré dans le chromosome de la souche MC4100 par *Hegreness*[72]. L'emplacement choisi par *Hegreness* pour insérer le gène *yfp* dans le génome rend son expression constitutive, il est donc toujours transcrit (contrairement à une expression facultative qui n'est activée que dans certaines conditions). Son expression résulte en une production permanente de protéine fluorescente jaune. Ainsi, toutes les bactéries fluorescent de façon continue à la longueur d'onde de la protéine YFP, et le signal émis par une population entière est donc proportionnel au nombre de microorganismes (sous certaines conditions discutées dans le paragraphe 2.2.2).

Afin de valider l'étude de l'impact du changement de taille des incubateurs, décrit dans le chapitre 3, nous avons également utilisé la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. Elle correspond également au type de microorganismes couramment responsables de contaminations industrielles.

Enfin, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été cultivée dans le dispositif automatisé présenté dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Tous ces microorganismes sont de classe 2 ou inférieure. C'est à dire que leur dissémination dans l'environnement est très peu probable et qu'il existe une prophylaxie ou des médicaments connus pour lutter efficacement contre leur éventuel pouvoir pathogène. Ils sont sans danger pour la communauté. Leur manipulation a donc été effectuée sous un poste de sécurité microbiologique.

2.2 Les méthodes de comptage de population en ligne

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons présenté plusieurs méthodes permettant de suivre l'évolution d'une population de microorganismes. Cependant, aucune de ces méthodes ne permet un suivi rapide, non-intrusif, en ligne, et quantitatif. Nous présentons ici le travail fait dans le but de développer

une méthode satisfaisant à tous ces critères. Certaines méthodes que nous avons envisagé ont montré un potentiel intéressant pour répondre partiellement aux objectifs que nous nous étions fixés, et proposer parfois des moyens d'accès à d'autres informations biologiques que le nombre de microorganismes. Ce sont ces méthodes que décrivons en premier lieu, en présentant les résultats préliminaires que nous avons obtenu. Ensuite nous décrivons plus en détail deux techniques qui se sont montrées efficaces pour le suivi d'évolution de population en respectant les critères fixés. Nous abordons d'abord une méthode couplant une mesure de fluorescence à une mesure d'absorbance, puis un comptage direct par observation microscopique en champ clair.

2.2.1 Des techniques intéressantes mais incomplètes

En plus du suivi d'évolution de population visé dans le cadre de nos travaux, il est parfois nécessaire de suivre l'évolution dans le temps d'autres paramètres que le nombre de microorganismes. Soit parce qu'ils donnent accès à une mesure indirecte de la population quand les méthodes directes ne sont pas applicables, soit parce qu'ils peuvent renseigner sur le métabolisme des cellules. La diffusion de lumière, et la thermographie-calorimétrie que nous allons décrire ici correspondent aux méthodes qui donnent accès indirectement à la population. La spectrométrie et l'utilisation de marqueurs fluorescents présentent une utilisation qui peut être double en renseignant soit sur le nombre de microorganismes, soit sur le métabolisme.

2.2.1.1 La diffusion de lumière

Des particules en suspension dans un milieu liquide diffusent la lumière. La façon dont elles vont diffuser un rayon incident dépend principalement de leur taille, de leur forme, et de leur organisation. En diffusion dynamique de la lumière, où l'on suit des fluctuations d'intensité diffusée dans le temps, on peut estimer la taille des particules en suspension. En diffusion statique, où l'on mesure l'intensité moyenne diffusée à un angle choisi, on peut obtenir des informations quand à l'organisation de la suspension (dont la concentration).

Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à évaluer la pertinence de ces méthodes pour le suivi de population de microorganismes en ligne, de façon non-intrusive et quantitative. Les mesures de diffusion dynamique de lumière ont

confirmé la taille des bactéries *Escherichia coli* à environ $2 \mu\text{m}$, correspondant à la taille attendue, quelle que soit la population de l'échantillon utilisé pour faire la mesure. La mesure statique a mis en évidence le lien entre intensité moyenne diffusée et population de l'échantillon (Figure 2.1). Cependant, la sensibilité et la complexité du montage de mesure rend cet outil difficile à envisager pour des études haut-débit. En revanche, pour des études ponctuelles, les méthodes de diffusion de lumière peuvent présenter un réel intérêt pour obtenir des informations sur les microorganismes auxquelles les autres méthodes ne donnent pas accès[73, 74].

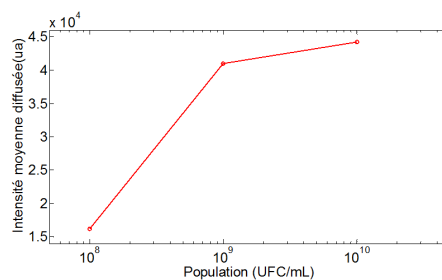


FIGURE 2.1: Résultats de mesures de diffusion statique de lumière par Ecoli à pop= $1e8$, $1e9$, $1e10$ à un angle de mesure de 20° .

2.2.1.2 La thermographie-calorimétrie

Chaque matériau possède une capacité à absorber et/ou restituer de la chaleur qui lui est propre. On appelle cette grandeur la capacité calorifique. Il a été montré que des milieux biologiques ont une capacité calorifique qui évolue avec la population qu'ils contiennent[75]. Ainsi, on peut envisager de suivre une évolution de population en mesurant la capacité calorifique du milieu au cours du temps. Les outils couramment utilisés pour la mesure de capacité calorifique ne permettent cependant pas de mesures en ligne, non-intrusives et rapides à la fois. Nous avons donc tenté d'exploiter l'outil récemment développé par *M.Romano*[76], qui vise à mesurer la capacité calorifique de gouttes en écoulement dans un capillaire pour l'obtention de données thermiques de réactions chimiques.

Des mesures réalisées sur des populations connues de *Escherichia coli* ont montré que la valeur de capacité calorifique d'une culture, mesurée en ligne, évolue bien de façon concordante avec le nombre de microorganismes présents dans la culture.

Le dispositif de mesure ayant été prévu pour l'étude de réactions chimiques, il ne permet pas, en l'état, de suivre l'évolution de ces paramètres en continu sur une culture de microorganismes. Cependant, après adaptation au suivi en ligne, cet outil pourrait donner accès à des suivis de populations sur tout type de microorganisme, cultivé sur tout type de milieu.

2.2.1.3 La spectrométrie Raman

La spectroscopie consiste à mesurer l'impact de l'interaction d'un milieu à étudier sur une lumière incidente connue. Ainsi, on peut obtenir des informations sur la nature et la quantité des composants du milieu de façon non-intrusive, rapide et quantitative.

Dans ce travail, nous avons cherché à évaluer le potentiel de la spectroscopie Raman pour le suivi de concentration d'un substrat commun (le glucose) dans des dispositifs miniaturisés. La Figure 2.2 montre les spectres obtenus pour différentes dilution de glucose en milieu aqueux (0, 90, 110, 130, 145, et 160 g/L). Les zones en rouge indiquent les pics propres au glucose et montrent qu'il est bien possible de le quantifier par cette technique. Toutefois, la consommation d'une population de microorganismes varie de l'ordre du gramme à quelques dizaines de grammes. On se trouve alors face à un problème de sensibilité de la méthode. Ce problème de sensibilité étant déjà connu, certains groupes de recherche ont développé des matériaux permettant l'exaltation du signal Raman du glucose via la résonance de plasmons de surface[77, 78](effet SERS pour "Surface Enhanced Raman Spectroscopy"). Bien que ces matériaux rendent possible la mesure en ligne, non-intrusive et quantitative du glucose, leur complexité de fabrication et difficulté de mise en œuvre rend difficilement applicable cette technique aux études haut-débit.

Toutefois, le potentiel des techniques spectroscopiques ne se limite pas aux mesures du glucose, et, dans le cas de croissances où l'un des substrats/métabolites présente une signature spectroscopique suffisante, ces techniques offrent un réel intérêt de par leur rapidité et facilité de couplage avec des outils miniaturisés.

2.2.1.4 Les marqueurs fluorescents

Certains couples oxydo-réducteurs possèdent un potentiel qui leur permet de s'insérer dans les chaînes de réactions métaboliques des microorganismes. Si les

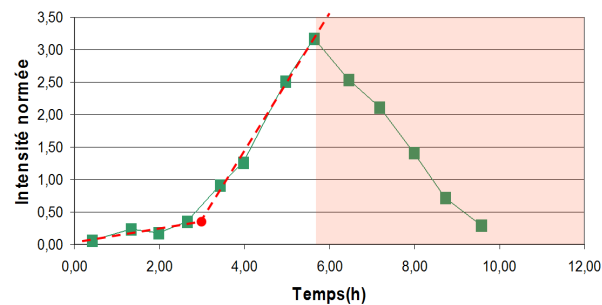


FIGURE 2.4: Suivi de culture de *E.coli* par mesure de la fluorescence de l'AlamarBlue, inoculation à 10^7 UFC/mL.

cellulaire pourraient permettre l'acquisition en ligne de données d'intérêt et non accessibles par les autres méthodes décrites ici.

2.2.2 La mesure de fluorescence couplée à l'absorbance

La bactérie *Escherichia Coli* MC4100-YFP possède l'allèle YFP du gène GFP dans son chromosome bactérien, ce qui génère la production d'une protéine fluorescente. La Figure 2.5 montre l'intensité de fluorescence mesurée sur une goutte contenant cette souche bactérienne. Il a été montré qu'en régime adapté, la fluorescence moyenne d'une suspension est proportionnelle au nombre de microorganismes[1]. Cependant, pour des régimes faiblement concentrés ou au contraire trop concentrés, la proportionnalité n'est plus respectée.

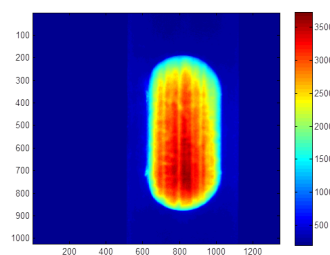


FIGURE 2.5: Goutte avec bactéries fluorescentes

La densité optique (DO ou absorbance) d'une suspension de microorganismes augmente drastiquement quand le nombre d'individus devient important (en général au-delà de 10^8 - 10^9 UFC/mL). En dessous de cette gamme, la DO ne varie pas avec la population. Au delà, la relation n'est plus linéaire. La proportionnalité dans la gamme optimale est la base du suivi de population par mesure

de densité optique. La DO, mesurée à travers un échantillon de longueur l , s'écrit:

$$DO = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \alpha.l \quad (2.1)$$

Avec I_0 l'intensité de lumière incidente sur l'échantillon, I l'intensité de lumière qui traverse l'échantillon, mesurée à 180° par rapport à la source et α un coefficient de proportionnalité fixe pour un milieu donné. Ainsi, si on se place du point de vue d'une bactérie en suspension, on se rend compte qu'elle ne reçoit pas toujours une intensité lumineuse d'excitation I_0^{exc} mais en fait une intensité $I^{exc}(x)$ qui dépend de sa position dans le milieu et de la densité optique du milieu de la façon suivante:

$$I^{exc}(x) = I_0^{exc} \cdot 10^{-DO(x)} \quad (2.2)$$

La valeur x correspondant à l'épaisseur du milieu de culture traversée par la lumière incidente pour parvenir à la bactérie. Sachant que la fluorescence d'un milieu non absorbant est proportionnelle au nombre de microorganismes, on peut écrire qu'une bactérie isolée recevant une lumière d'excitation I_0^{exc} va émettre une intensité de fluorescence I_{1bact}^{em} :

$$I_{1bact}^{em} = k \cdot I_0^{exc} \quad (2.3)$$

Où k est une constante de proportionnalité (fluorescence d'un seul microorganisme). En remplaçant le terme I_0^{exc} de l'équation (2.3) par le terme corrigé $I^{exc}(x)$ de l'expression (2.2), on obtient l'expression de $I_{1bact}^{em}(x)$ tenant compte de l'absorbance pour une bactérie séparée de la source par une épaisseur x de milieu :

$$I_{1bact}^{em}(x) = k \cdot I_0 \cdot 10^{-DO(x)} \quad (2.4)$$

Dans un milieu homogène la densité optique moyenne vaut:

$$DO_{moy} = \frac{DO(l) + DO(0)}{2} = \frac{\alpha.l + \alpha.0}{2} = \alpha \cdot \frac{l}{2} = \frac{1}{2} \cdot DO(l) \quad (2.5)$$

D'où l'intensité de fluorescence moyenne émise dans une suspension homogène de N bactéries:

$$I_N^f = N \cdot k \cdot I_0 \cdot 10^{-\frac{1}{2} \cdot DO(l)} \quad (2.6)$$

La valeur mesurée expérimentalement ne correspond cependant toujours pas à l'expression 2.6. En effet, l'intensité de lumière émise par fluorescence doit, à son tour, traverser le milieu de culture afin d'atteindre le capteur. Il est donc

nécessaire d'appliquer une correction équivalente à celle de la lumière incidente pour la lumière émise.

Une valeur de DO étant définie pour une longueur d'onde donnée, il conviendrait donc de corriger les notations ci-dessus par $DO_{\lambda exc}$ et utiliser une $DO_{\lambda em}$ pour corriger le signal de fluorescence émis. Cependant, la protéine YFP produite par les bactéries présente des pics d'excitation et d'émission respectivement à 514 nm et 527 nm, c'est-à-dire très proches. Par soucis de simplification et après validation expérimentale, nous avons donc admis:

$$DO_{\lambda exc} = DO_{\lambda em} \quad (2.7)$$

Et cela nous permet d'écrire une intensité de fluorescence corrigée, proportionnelle au nombre de bactéries dans le milieu même en régime concentré:

$$I_c^{f_{orr}} = N.k.I_0.10^{-\frac{1}{2}DO(l)}.10^{-\frac{1}{2}DO(l)} = N.k.I_0.10^{-DO(l)} \quad (2.8)$$

La mesure de la valeur $I_c^{f_{orr}}$ et de $DO(l)$ permet donc de calculer la population N au facteur k près. Pour accéder à cette valeur expérimentalement, des mesures de fluorescence (Excitation: 514 nm, Mesure: 527 nm) et d'absorbance (Excitation: 527nm, Mesure: 527nm) sont effectuées à chaque temps de mesure selon le même chemin optique. La Figure 2.6 montre la comparaison entre des courbes de croissance obtenues par mesure couplée Fluorescence-Absorbance et une référence en comptage sur boîte de Pétri. La courbe de fluorescence-absorbance présentée a été obtenue par mesure dans une cuve de spectroscopie de section carrée de 1 cm de côté et correction de la fluorescence par l'absorbance comme décrit précédemment. La courbe en pointillés est donnée afin de faciliter la comparaison des données de fluorescence-absorbance avec la référence par étalement sur boîte de Pétri. Le facteur multiplicatif correspond à la population initiale, soit 10^5 .

2.2.3 La microscopie de champ clair

Avec le développement de la miniaturisation, de nombreux travaux ont vu le jour exploitant la possibilité d'observer les microorganismes à l'échelle des individus[3, 81, 82]. Cependant, ces techniques ne permettent pas de suivi de

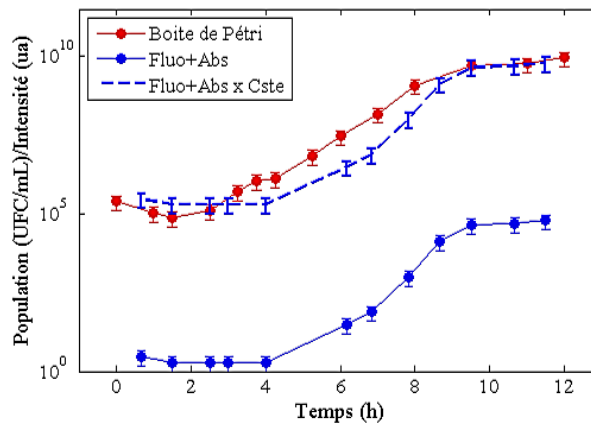


FIGURE 2.6: Comparaison du suivi de croissance de *Escherichia Coli* dans le TSB (Tryptic Soy Broth) à 30g/L à 30°C en erlenmeyer de 100mL par comptage sur boîte de Pétri (référence) et par mesure couplée de fluorescence et d'absorbance en cuve spectroscopique de 1cm.

population rapide, en ligne, non-intrusif, et quantitatif. Nous avons donc ici mis au point une méthodologie qui permet d'exploiter le potentiel d'observation des faibles échelles de taille, tout en satisfaisant aux critères de l'accès au haut-débit. Les tubes millifluidiques décrits en détail dans la seconde partie de ce chapitre ont été utilisés pour cela. Nous détaillons ci-dessous, ainsi que dans la Figure 2.7, la méthodologie à appliquer pour obtenir des suivis de croissance de microorganismes cultivés en gouttes millifluidiques dans des tubes transparents.

- L'acquisition d'images:

Les séries d'incubateurs millifluidiques sont des tubes de 10 à 30 centimètres de long et de 0,25 à 2,2 millimètres de diamètre interne contenant chacun entre 5 et 30 gouttes de la culture à suivre. De façon à obtenir la concentration en microorganismes dans chaque goutte, les tubes sont placés sur une platine motorisée au moment de chaque mesure, qui déplace le tube dans le sens de sa longueur, devant un objectif adapté (Figure 2.7). Nous utilisons pour nos mesures un objectif 100X à immersion eau installé sur un microscope supportant également la platine motorisée et une caméra rapide. La focalisation est faite dans le plan médian du tube et l'illumination provient d'une source de lumière blanche, au-dessus de l'échantillon. Avec ce dispositif, l'enregistrement d'une série d'images correspond à la visualisation du

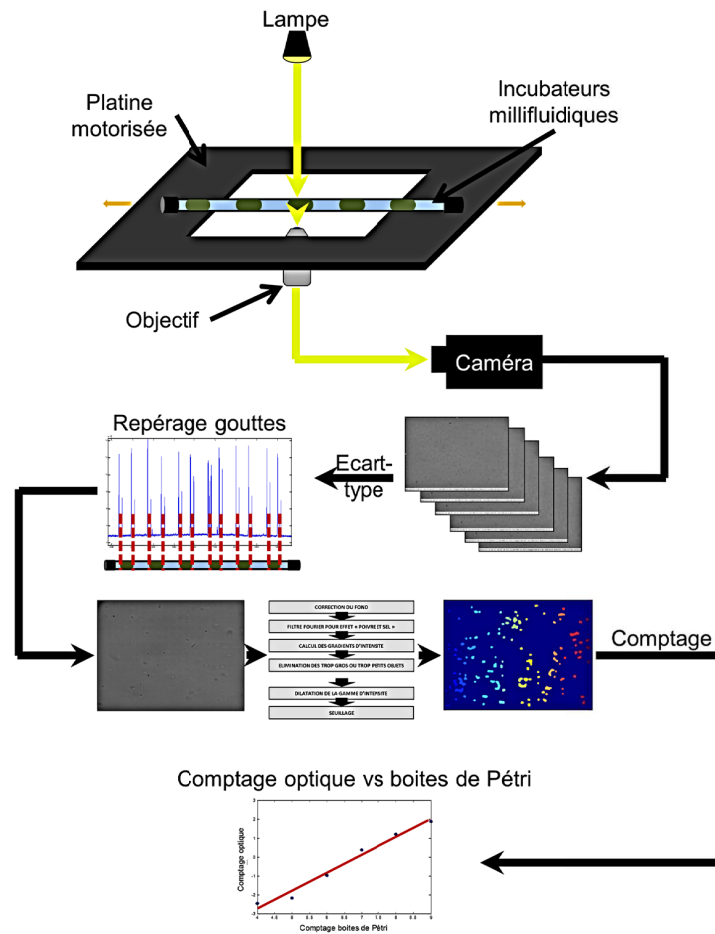


FIGURE 2.7: Méthodologie de suivi de population par comptage optique en millifluidique.

plan moyen du tube, tout au long de ce dernier (c'est-à-dire à travers toutes les gouttes, mais aussi la phase huile qui entoure les gouttes).

- Le traitement d'images:

En choisissant convenablement les paramètres d'éclairage et d'acquisition vidéo, les images obtenues se chevauchent à peine, de façon à couvrir l'intégralité du tube sans saturer la mémoire de la caméra. Ces paramètres sont cruciaux en vue de suivis de croissance rapides. En effet, une série d'images en pleine résolution avec une vitesse d'acquisition élevée atteint rapidement une taille de l'ordre du gigaoctet, et quand les mesures sont effectuées sur

plusieurs tubes, à intervalles de temps réguliers, des volumes de données importants sont rapidement emmagasinés. L'analyse des images doit donc être rapide afin de gérer ce volume de données.

Les étapes du traitement sont : 1) l'identification des gouttes, 2) le traitement mathématique de l'image, 3) le dénombrement des microorganismes. Le repérage des gouttes est basé sur l'important contraste qui apparaît du passage d'une phase à l'autre. Ainsi, la première phase du traitement consiste à mesurer l'écart type moyen de chaque image d'une série, et à le tracer en fonction du numéro d'image. Les pics d'écart type correspondants aux interfaces eau/huile, il est possible de repérer les gouttes et d'éliminer les images correspondantes à la phase huile. Ensuite, une série de transformations mathématiques (décrites dans la Figure 2.7) est appliquée à chaque image restante afin d'optimiser le contraste entre les microorganismes et le milieu, et d'éliminer les défauts optiques. Enfin, chaque image est seuillée et les microorganismes dénombrés. Cependant, des images ne contenant aucun microorganisme subissant ce traitement entraînent souvent de faux positifs lors du comptage (les imperfections sont exacerbées et sont comptés après seuillage). Pour éviter ce phénomène, un critère est établi de façon à écarter automatiquement ce biais: l'expérience montre que les "faux positifs" donnent toujours un nombre de microorganismes dénombrés comparables. Lorsque le compte est proche de cette valeur, l'image est écartée.

- Obtention des courbes de croissance:

Le dénombrement ayant été effectué, et connaissant la correspondance entre chaque image et la goutte à laquelle elle correspond, il est possible de connaître le nombre moyen de microorganismes dans le plan médian de chaque goutte. Ce nombre étant proportionnel à la population, on obtient directement la population dans chaque incubateur millifluidique. Les mesures étant répétées à intervalles de temps réguliers, il suffit d'associer chaque valeur de population au temps à laquelle la mesure a été effectuée pour obtenir la courbe de croissance correspondante à chaque goutte.

Dans cette première section, nous avons vu que la recherche de techniques analytiques adaptées au haut-débit a permis d'en identifier deux qui présentent

un potentiel intéressant: la fluorescence/absorbance, et le comptage microscopique direct. Ces deux méthodes rendent donc possible un comptage de population en ligne, non-intrusif et quantitatif. Cependant, augmenter la vitesse de mesure de population n'est pas suffisant pour permettre des suivis de croissance en grand nombre. Il est en effet nécessaire d'augmenter également le nombre de cultures simultanées pour pouvoir tester un grand nombre de conditions à la fois. Pour cela, nous proposons dans la section suivante une description des outils fluidiques miniaturisés et leur adaptation à la culture de microorganismes parallélisée.

2.3 Faire croître des microorganismes en gouttes

Deux méthodes de miniaturisation ont été utilisées pour ce travail. Dans un premier temps la millifluidique, qui donne accès à des échelles caractéristiques de l'ordre du millimètre, pour des volumes de l'ordre de 10 à 1000 microlitres, puis la microfluidique, qui permet de travailler avec des volumes compris entre quelques nanolitres et quelques microlitres pour des échelles caractéristiques pouvant varier du micromètre à la centaine de micromètres.

2.3.1 Brève présentation des outils fluidiques miniaturisés

Le nombre de Reynolds d'un écoulement fluide est directement proportionnel à la dimension caractéristique du système. Ainsi, à des échelles réduites, l'écoulement sera laminaire dans la très grande majorité des cas[83]. Cette caractéristique de la millifluidique et de la microfluidique permet la génération d'écoulements d'une grande stabilité et répétabilité. Ces propriétés se révèlent clé dans le type d'applications que l'on souhaite traiter dans ce travail de thèse, c'est-à-dire la production rapide et la gestion d'un grand nombre d'échantillons. En effet, il est possible de générer dans ces systèmes des écoulements multiphasiques stables sous forme soit de "jet" soit de "gouttes" selon les débits respectifs de chaque fluide[84–86](Figure 2.8).

Nous nous intéresserons particulièrement à l'écoulement en gouttes d'un fluide dans une phase dite "porteuse" composée d'un second fluide immiscible au premier. Comme expliqué ci-dessus, la génération et l'écoulement ou stockage de ces gouttes peut se faire de façon rapide et très répétable en millifluidique[87] et

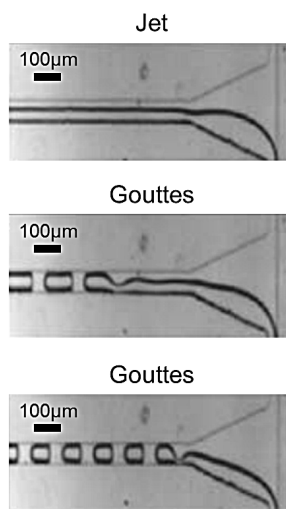


FIGURE 2.8: Ecoulement biphasique en microfluidique sous forme de "jet" (courbe du haut), ou de gouttes (deux courbes du bas). Reproduit à partir de la référence [85].

en microfluidique[88]. Nous détaillons ici les techniques expérimentales associées à ces deux méthodes.

2.3.1.1 La millifluidique

Les outils qui sont utilisés en millifluidique sont majoritairement issus des développements de la chromatographie. Des outils permettant de connecter de façon rapide et étanche des tubes de diamètre interne millimétrique sont donc disponibles commercialement sous diverses formes (Figure 2.9). Ils permettent de réaliser des connections linéaires entre tubes, des connections en "T" ou en "croix", etc. . . Des éléments actifs peuvent également être utilisés, tels que des vannes, des micro-mélangeurs, etc. . . Ces connectiques, tout comme les tubes en eux-mêmes, existent dans des matériaux divers qui s'adaptent à des applications variées. On peut citer le FEP (Fluoro Ethylène Propylène) et le PTFE (Poly Tetra Fluoro Ethylène) parmi les matériaux les plus couramment utilisés pour leur grande inertie chimique et leur transparence ou encore le PEEK (Poly Ether Ether Ketone) pour sa robustesse.

Ces outils offrent des possibilités très vastes pour la réalisation rapide et simple de circuits d'écoulement. La mise en écoulement des fluides à l'intérieur d'un circuit millifluidique peut se faire de deux façons principales : débit imposé en entrée du système, ou différence de pression imposée entre l'entrée et la sortie du

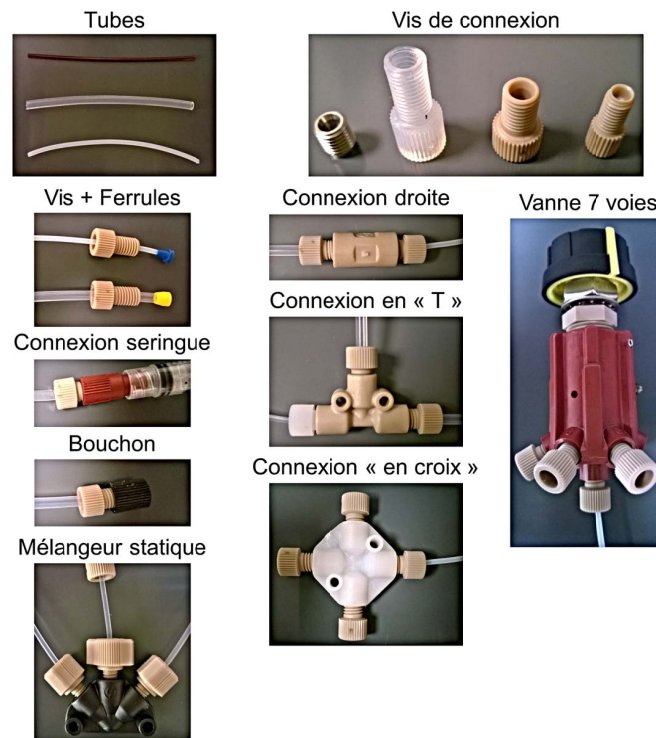


FIGURE 2.9: Exemples de matériel utilisé pour la fabrication de circuits millifluidiques.

système. Pour imposer un débit (écoulement de liquides incompressibles), il est possible d'utiliser une pompe péristaltique. La faible précision de cette dernière la rend cependant peu appropriée pour des écoulements de faibles volumes. La méthode la plus courante de contrôle de débit en millifluidique est l'utilisation d'un pousse-seringue. Le principe est de bloquer le corps d'une seringue connectée au système millifluidique, alors que le piston est solidarisé avec une pièce mécanique mobile et précisément contrôlable. Bien souvent, la pièce solidarisée au piston est mise en mouvement à l'aide d'une vis d'archimède (en passant ou non par des découplages) dont la rotation est pilotée par un moteur. La précision du moteur et le pas de vis déterminent la précision finale du débit imposé. Pour piloter l'écoulement par une différence de pression, des contrôleurs de pression sont connectés à l'entrée et/ou à la sortie du circuit. Souvent, les fluides à mettre

en écoulement sont placés dans des récipients étanches, connectés à l'entrée du circuit, avec présence d'un ciel gazeux, et la régulation de pression se fait alors dans ce récipient. La sortie du circuit peut rester ouverte, la différence de pression se fait alors par rapport à la pression atmosphérique, ou bien être raccordée à un récipient du même type qu'en entrée où la pression peut être choisie. La Figure 2.10 illustre deux méthodes de contrôle d'écoulement.

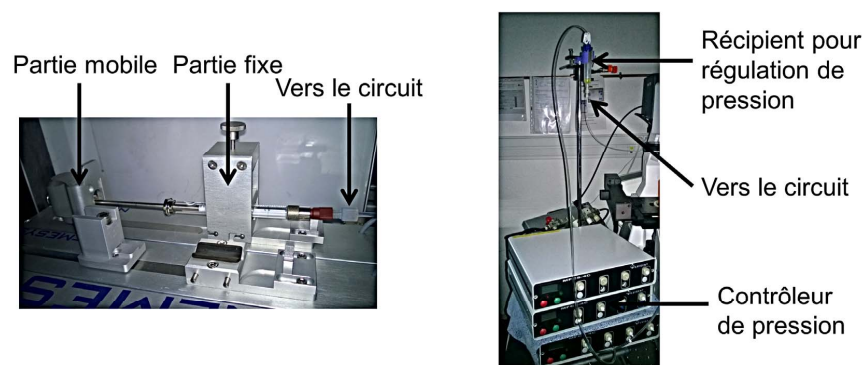


FIGURE 2.10: Exemples de matériel utilisé pour la mise en écoulement des fluides dans un circuit millifluidique.

2.3.1.2 La microfluidique

A l'échelle microfluidique, il n'existe pas de système aussi adaptable qu'en millifluidique. La réalisation de circuits d'écoulements de taille micrométrique requiert l'utilisation de techniques de microfabrication. Ces techniques permettent de tracer des canaux dans un matériau choisi pour y faire ensuite s'y écouler des fluides. Le réseau de canaux obtenu est appelé "puce microfluidique". Il est possible de fabriquer des puces en verre[89, 90], silicium[91], PDMS (Poly-DiMethylSiloxane)[92, 93], polymère photoréticulable (SU-8, NOA, ...)[94, 95], polymère fluoré (Dyneon THV, ...)[96], PMMA (Poly-MethylMethAcrylate)[97], etc... ou encore par combinaison de ces matériaux.

Malgré des spécificités telles que la gravure à l'acide fluorhydrique pour les puces en verre ou le moulage à chaud pour les polymères, ces protocoles sont proches les uns des autres et passent en grande majorité par une étape de lithographie douce. La lithographie permet de transférer un motif à deux dimensions (un dessin ou schéma) sur une surface solide. Le transfert consiste à "graver" le motif sur la surface et la profondeur de gravure permet de faire apparaître la troisième dimension du futur circuit d'écoulement. En pratique, une couche de résine photoréticulable est déposée de façon homogène sur un substrat, puis la résine est insolée avec une puissance ajustée pour provoquer la réticulation au travers d'un masque sur lequel a été imprimé le motif à transférer. Le masque bloque la lumière sur certaines parties de la résine, y reproduisant ainsi le motif. La résine n'ayant pas été exposée peut ensuite être retirée par dissolution dans un solvant adapté. A partir du motif obtenu par lithographie douce, le protocole de microfabrication se spécialise en fonction du matériau utilisé. Sa facilité d'utilisation fait du PDMS le matériau le plus utilisé. En effet, il suffit de couler le polymère sur le moule obtenu après lithographie et de le faire réticuler par chauffage pour reproduire le motif. Le motif en trois dimensions obtenu possède, après démoulage du PDMS, une face ouverte (le côté qui était en contact avec la résine). Il suffit alors de le coller sur une surface plane de PDMS ou de verre (par activation plasma, gradient de réticulant, ...) pour fermer les canaux et sceller ainsi le circuit microfluidique. La souplesse du PDMS permet de facilement percer des trous au travers afin de pouvoir injecter les fluides dans le système par le biais de tubes capillaires. Un exemple de protocole de microfabrication de puce PDMS est décrit dans la Figure 2.11. Les systèmes de contrôle des flux sont identiques à ceux utilisés pour la millifluidique.

2.3.2 Mini-incubateurs utilisés pour ce travail de thèse

L'intérêt d'utiliser des outils miniaturisés pour les études microbiologiques a été discuté dans le Chapitre 1. La présentation générale de ces outils a été faite ci-dessus, et nous allons maintenant présenter les spécificités des outils miniaturisés destinés à des cultures de microorganismes. Nous commençons par exposer les conditions et critères à respecter pour permettre la culture microbienne dans de tels incubateurs, puis nous parlerons des outils que nous avons mis en place dans le cadre de ce travail de thèse.

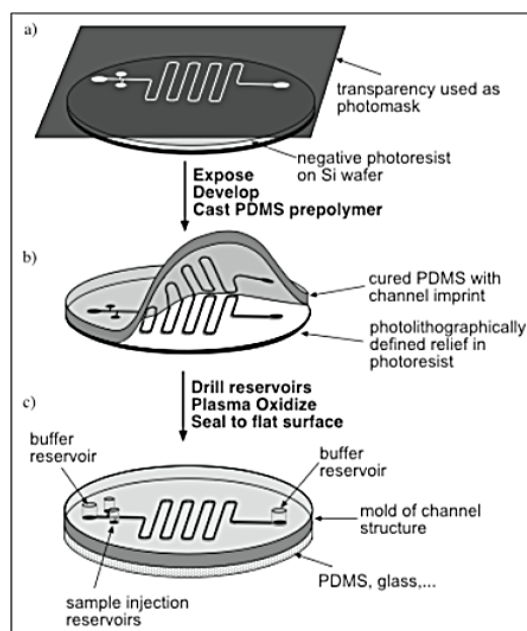


FIGURE 2.11: Protocole de microfabrication de puces microfluidiques en PDMS: a) Lithographie douce, b) Moulage du PDMS, c) Fermeture de la micropuce par collage sur lame de verre.

2.3.2.1 Les conditions de croissance

De nombreuses configurations peuvent être envisagées afin de faire croître des microorganismes dans des incubateurs miniaturisés. La culture peut être faite en microfluidique ou bien en millifluidique, en milieu homogène ou en gouttes, etc. . . Toutefois, il existe des critères que tous ces systèmes doivent respecter pour que les microorganismes puissent croître de façon optimale.

Le premier critère est celui de la biocompatibilité. En effet, il est essentiel que les matériaux et/ou fluides pouvant entrer en contact avec le milieu de culture n'impactent pas le développement des cellules. L'utilisation de matériaux biocompatibles pour la manipulation, les écoulements, et le stockage des fluides est donc cruciale.

Il est ensuite nécessaire de pouvoir travailler avec des systèmes stériles. Tout comme le contact avec des matériaux nocifs perturberait la croissance, le contact avec des surfaces potentiellement contaminées par d'autres microorganismes que

celui d'intérêt fausserait l'étude. Pour cela, le système miniaturisé doit être compatible avec, au moins, une des méthodes de stérilisation telles que l'autoclavage, le rinçage à l'éthanol à 70% ou l'exposition aux UV. De même, tous les fluides utilisés doivent être autoclavés ou filtrés de façon à pouvoir satisfaire aux critères de stérilité.

Enfin, l'affinité des surfaces avec les fluides utilisés doit permettre la formation de gouttes pour des systèmes de ce type. La résistance chimique et l'étanchéité des matériaux doivent être sélectionnées de façon à permettre une conservation du système à long-terme. Le fluide ne doit pas pouvoir perméer à travers et aucune contamination ne doit atteindre le milieu.

2.3.2.2 La mise en place et validation expérimentale

L'objectif fixé dans le cadre de ces travaux de thèse est de pouvoir faire croître des microorganismes dans des dispositifs miniaturisés pour suivre leur croissance *in-situ* et accéder ainsi au haut-débit pour des études d'évolution de population. Nous avons pour cela envisagé deux types d'outils miniaturisés: des incubateurs millifluidiques, et des incubateurs microfluidiques.

- Millifluidique

Les outils millifluidiques présentés dans le paragraphe 2.3.1.1 offrent l'avantage de satisfaire directement aux critères de croissance énoncés précédemment. La flexibilité d'utilisation permet ainsi d'imaginer des circuits de génération et de stockage de milli-incubateurs compatibles avec la croissance de microorganismes. L'objectif de notre étude étant le suivi de croissance simultané dans plusieurs incubateurs contenant des milieux de compositions différentes, il a été choisi de concevoir séparément un module de génération d'incubateurs, et un module de stockage des incubateurs.

En amont de la génération des mini-incubateurs, leur composition est fixée par la co-injection de chacun des composants à un débit proportionnel à la fraction volumique souhaitée. Par exemple, pour contrôler la concentration en produit A dans une culture de microorganismes MO avec un milieu de culture MC: le débit d'injection de l'inoculum MO peut être fixé à 20% du

débit total de façon à avoir une population initiale constante, et les débits de A et MC sont modulés pour que leur somme corresponde à 80% du débit total. Ainsi, la composition des mini-incubateurs générés pourra varier entre 0% et 80% de produit A, sans que le débit total ne fluctue et tout en conservant un taux d'inoculation constant. Le schéma de la Figure 2.12 représente la gestion des flux permettant l'ajustement de composition et la génération de mini-incubateurs décrite ci-dessous.

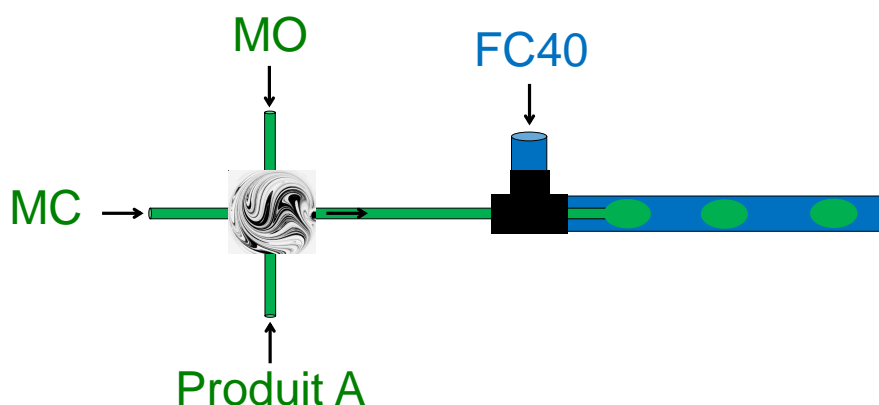


FIGURE 2.12: Méthode de génération de gouttes en millifluidique

Le passage par un système de mélange miniaturisé permet d'homogénéiser l'injection dans le dispositif de génération de gouttes. La Figure 2.13 représente le système de génération. La phase aqueuse est injectée dans un capillaire en PFA de faible diamètre (1 mm interne x 1.6 mm externe), correspondant à la phase en blanc sur la Figure 2.13. La phase huile composée de Fluorinert FC-40 est alors co-injectée dans un capillaire en PFA de diamètre supérieur (2.2 mm interne x 3,2 mm externe), placé co-axialement au premier. En géométrie confinée, la formation de gouttes périodiques ne se fait que si la phase externe mouille préférentiellement le capillaire[98]. La formation de gouttes est due à l'instabilité de Rayleigh-Plateau qui perturbe l'interface entre les fluides lors de la mise en co-écoulement. Ce système permet donc la génération de train d'incubateurs isolés et de composition bien contrôlée. Une fois produits, les incubateurs suivent l'écoulement en

direction du dispositif de stockage.



FIGURE 2.13: Méthode de génération de gouttes en millifluidique

Les connectiques disponibles commercialement permettent de connecter deux capillaires par simple vissage/dévisage. Ainsi, il est possible de diriger le train d'incubateurs dans un capillaire de longueur voulue et d'isoler ce dernier en bouchant les extrémités. La Figure 2.14 présente des capillaires de ce type contenant un train de gouttes colorées en rose dans une phase porteuse d'huile incolore. Les capillaires peuvent ensuite être placés dans une enceinte thermostatée pour l'incubation. Pour éviter la sédimentation des microorganismes, il est possible d'imposer une rotation aux capillaires.

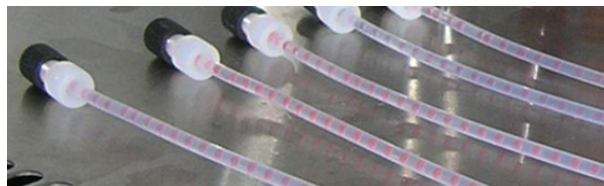


FIGURE 2.14: Méthode de stockage de gouttes en millifluidique

Une caractéristique importante des tubes en PFA utilisés pour le stockage des incubateurs miniaturisés est leur perméabilité aux gaz. En effet, bien qu'étanches aux liquides, ils permettent une lente diffusion des gaz qui peut être négligée à l'échelle de temps d'un écoulement classique (pendant la génération de gouttes par exemple) mais qui est suffisante pour satisfaire les besoins (oxygène, dioxyde de carbone) de microorganismes à l'échelle de temps de leur croissance.[99].

Afin de valider la méthode décrite ici pour la culture de microorganismes vis-à-vis des méthodes couramment utilisées, des croissances ont été réalisées en parallèle sur ce dispositif et en erlenmeyers. Pour pouvoir suivre l'évolution

de populations par une méthode connue et éprouvée, plusieurs capillaires ont été remplis en parallèle par des trains d'incubateurs identiques. De cette façon, un capillaire complet (cumul de toutes les gouttes) a pu être utilisé pour chaque comptage, équivalant au prélèvement effectué dans le cas de suivi de cultures en erlenmeyer. La courbe présentée dans la Figure 2.15 expose les évolutions de population en erlenmeyer et en milli-incubateurs, issues de comptages sur boîtes de Pétri.

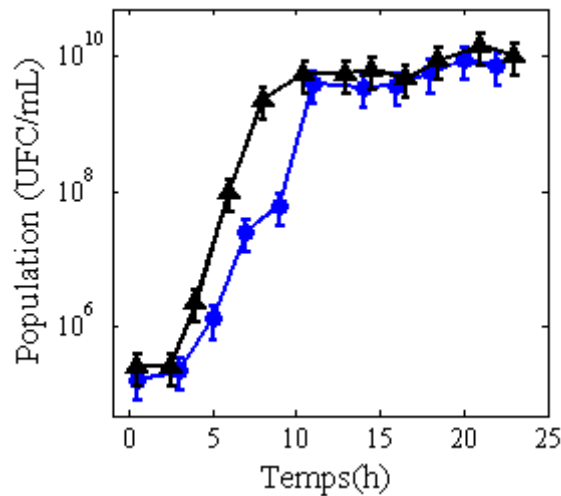


FIGURE 2.15: Comparaison des courbes de croissance obtenues en erlenmeyer et en gouttes.

A partir de cette courbe, il est possible d'affirmer que la croissance de microorganismes en gouttes est tout à fait comparable à une croissance en dispositif "classique". Cependant, il est important de remarquer que les courbes ne sont pas parfaitement similaires. Cela tend à indiquer que le développement des microorganismes ne suit pas parfaitement le même déroulement dans les deux conditions d'incubations testées. Dans le chapitre 3 de ce manuscrit, nous avons mené une étude approfondie destinée à sonder ces différences. Les observations expérimentales ont ainsi pu être appréhendées à l'aide d'un modèle numérique simple qui a mis les paramètres clés en évidence.

- Microfluidique

Parmi les techniques de microfabrication décrites précédemment, peu satisfont à tous les critères nécessaires à la croissance de microorganismes. Seules les puces en PDMS et polymère permettent des échanges gazeux suffisants pour des croissances d'organismes aérobies tout en étant biocompatibles. De plus, pour pouvoir manipuler un grand nombre d'incubateurs isolés à la fois, le choix de travailler avec des gouttes plutôt qu'en milieu homogène nous apparaît comme préférable. Les polymères fluorés présentent les mêmes avantages que les tubes millifluidiques et permettent une génération de goutte aisée sans avoir recours à un tensioactif. Cependant, leur fabrication est plus délicate et moins maîtrisée que celle de puces en PDMS. Au contraire, les puces en PDMS nécessitent une fabrication peu sensible mais l'utilisation de tensioactifs est inévitable pour pouvoir y générer des gouttes stables de phase aqueuse dans de l'huile perfluorée.

Dans une synthèse sur les agents tensioactifs destinés à la microfluidique, *Baret* liste en 2011 les molécules les plus efficaces pour la stabilisation de gouttes de phase aqueuse dans de l'huile perfluorée pour applications biologiques[100]. Il apparaît dans cette étude que les seules molécules efficaces pour des applications de culture de microorganismes en gouttes ne sont pas disponibles commercialement et doivent être synthétisées "maison"[101]. De plus, il a été montré que la présence de tensioactifs dans la phase huile peut donner lieu à des phénomènes de transport inter-gouttes[102], rompant ainsi l'isolement entre mini-incubateurs que l'on recherche. Nous avons donc fait le choix de concentrer nos efforts vers la microfabrication de puces en polymère fluorés afin d'éviter l'étape de synthèse du tensioactif, et le transport associé à son utilisation.

Les protocoles de fabrication maîtrisés au laboratoire ne permettant pas la fabrication de ce type de micro-puces, nous nous sommes basés sur un protocole décrit par *Begolo et al*[96]. Une phase de mise en place et d'adaptation de la méthode nous a ainsi permis d'aboutir au procédé de fabrication décrit sur la Figure 2.16. Le matériau utilisé pour la fabrication de ces puces est du DyneonTM THV (3M), qui est un terpolymère de tétrafluoroéthylène ($F_2C = CF_2$), hexafluoropropylène ($F_2C = CF - CF_3$) et fluorure de vinylidène ($CH_2 = CF_2$), et présente entre autres les avantages d'être moins coûteux et plus facile à mettre en forme que les autres matériaux fluorés

(FEP, PFA, ...).

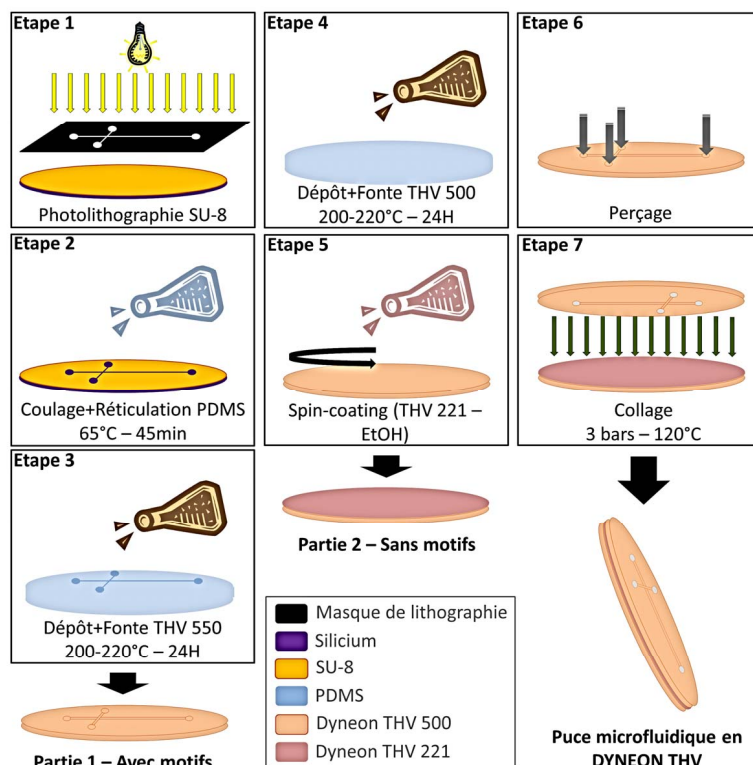


FIGURE 2.16: Protocole de microfabrication de puces microfluidiques en Dyneon THV.

L'objectif de ce dispositif microfluidique est de pouvoir générer des incubateurs miniaturisés, puis de les stocker sur des échelles de temps de l'ordre de la journée. Pour cela, le motif de la puce a été conçu en incluant une partie génération de gouttes par "flow-focusing" [103], et une partie incubation par arrêt des gouttes dans des loges [104]. Comme en millifluidique, la composition de la phase aqueuse est régulée par la gestion des flux de chaque composant en amont de la génération. Des micromélangeurs [68] peuvent être intégrés à la puce afin d'assurer l'homogénéité de la phase aqueuse. La Figure 2.17 présente un exemple de puce complète, de la partie génération, et de la partie stockage.

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'exploration de méthodes analytiques physico-chimiques de façon à évaluer leur potentiel pour le suivi de croissance microbologique. Nous avons aussi vu les développements qui ont été nécessaires

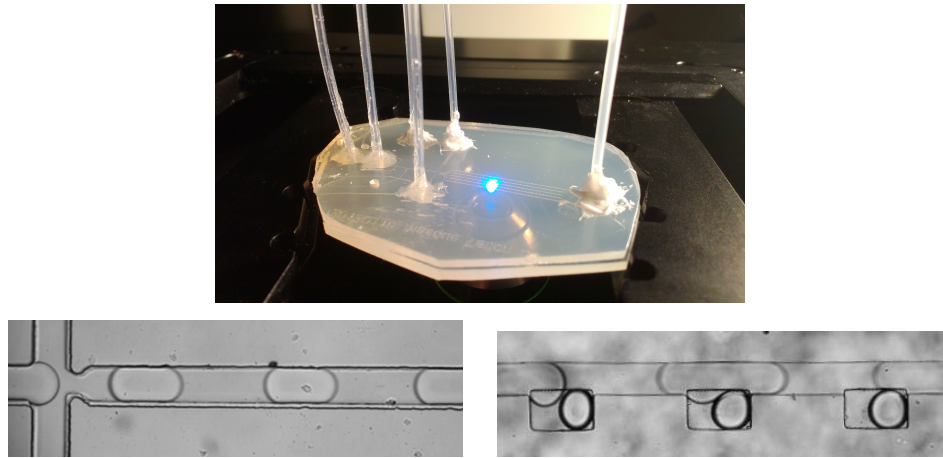


FIGURE 2.17: Exemple de puce microfluidique en Dyneon THV (en haut), et de canaux microfluidiques de génération de gouttes (en bas à gauche), et de stockage de gouttes (en bas à droite).

afin de rendre possible la croissance de microorganismes en gouttes isolées et parallélisées. La réduction de taille des incubateurs implique forcément des conditions de croissance différentes pour les microorganismes. Comme le montre la Figure 2.15, ces différences peuvent entraîner des comportements différents. Dans le prochain chapitre, nous nous attachons à étudier l'impact de cette réduction d'échelle en identifiant les paramètres clés grâce à des observations expérimentales, et en estimant leur impact par le biais d'un modèle numérique.

POINTS CLÉS DU CHAPITRE:

- Le suivi d'évolution de population de microorganismes haut-débit nécessite l'utilisation d'une technique analytique applicable à une large gamme de populations, en ligne, non-intrusive, quantitative et rapide.
- La mesure de la fluorescence sur des microorganismes modifiés, couplée à une mesure d'absorbance, ainsi que le comptage par observation microscopique directe satisfont aux critères du haut-débit.
- Des dispositifs microfluidiques et millifluidiques permettent la culture de microorganismes dans des incubateurs de volume inférieur à la dizaine de microlitres. Cela donne accès à une grande capacité de parallélisation d'incubateurs.
- Les systèmes millifluidiques sont simples et flexibles d'utilisation. Ils sont donc préférés aux systèmes microfluidiques pour la mise en place d'un outil haut-débit destiné à une utilisation routinière.

Chapitre 3

Les conditions de croissance à travers les échelles

3.1 Présentation du chapitre

La croissance de microorganismes est régulée par leur environnement. La température du milieu, sa composition, la pression etc... sont des paramètres qui influent sur la vitesse à laquelle les cellules peuvent se répliquer, sur la concentration maximale qu'elles peuvent atteindre ou encore sur leur mort. Les microorganismes utilisés pour les études en laboratoire et leur comportement en dispositif de culture classique (type erlenmeyer) sont souvent bien connus. Cependant, nous avons proposé dans le chapitre précédent des systèmes de culture miniaturisés qui impactent forcément les conditions de croissance des microorganismes. En vue d'utiliser ces systèmes en complément ou en place des dispositifs classiques, il paraît donc essentiel d'étudier l'impact de ce changement de conditions sur la croissance.

Nous avons pour cela réalisé des suivis de croissance dans différents incubateurs, et mesuré les populations par dilutions successives et étalement sur boîtes de Pétri au cours du temps. Les premières observations ont confirmé l'impact des conditions de culture sur la vitesse de croissance et les populations maximales (en phase stationnaire), la phase de décès n'a pas été étudiée. L'analyse d'une série d'expériences rassemblant diverses conditions a permis d'identifier l'oxygène comme le facteur limitant de la vitesse de croissance en phase exponentielle. La population de la phase stationnaire est quant à elle dépendante à la fois de la quantité d'oxygène disponible et de la quantité de nutriments.

Ainsi, des incubateurs de tailles réduites qui permettent à la diffusion de transporter efficacement l'oxygène dans tout le milieu favorisent une vitesse de croissance élevée. Cependant, dans les milieux où la réserve d'oxygène est limitée, son épuisement entraîne un arrêt prématuré de la croissance, qu'elle que soit la taille de l'incubateur. Dans le cas où la quantité d'oxygène n'est pas limitante, une concentration initiale en nutriments trop faible entraîne également l'arrêt de croissance à une population de phase stationnaire inférieure à l'optimum.

Un modèle numérique basé sur les équations de diffusion/consommation de l'oxygène et des nutriments, et sur une loi de croissance fonction de la concentration locale en oxygène, a permis de retrouver par le calcul les résultats expérimentaux. Cet accord entre le modèle et les expériences valide l'identification de l'oxygène et des nutriments comme les paramètres clés de contrôle du développement des microorganismes dans nos incubateurs.

3.2 Introduction

Microfluidics is an attractive platform for microbiology[46, 56], clinical tests [105] and biotechnologies[4, 106]. Droplets of aqueous solution surrounded by a fluorinated carrier fluid — provide a simple method for manipulating samples with no dispersion or losses to interfaces[88].

Encapsulation of microbial populations in droplets[48] (in particular experiments on single cells[42, 107]) and the monitoring of their behavior is likely to be helpful in the study of genetic and phenotypic variability of microorganisms[69]. Microfluidics enables simultaneous execution of numerous assays of bacterial function from a single bacterial sample in the same experiment[70]. It can simplify the determination of resistance of bacterial isolates to antimicrobial agents. Recently, Boedicker *et al* [108] and Baraban *et al* [1] demonstrated the possibility of performing antibiogram assays on a chip. Microfluidic technology has great potential to improve stem cell cultures [109]. Compared to traditional culture tools, microfluidic platforms should provide much greater control over the cell microenvironment[67] and rapid optimization of media composition using relatively small numbers of cells[70]. For example, precise and thorough combinatorial studies with multiple growth factors are technically infeasible using traditional cultures, and traditional cultures require relatively large volumes of media and correspondingly large amounts of costly growth factors and other reagents.

Microbes and their metabolic products are also widely used in the chemical, food, pharmaceutical, and health care industries[110] as well as new industries such as environmental remediation, green chemistry, sustainable manufacturing, biomass energy and resources, and low-carbon biodiesel [111, 112]. Improvement in the microbial production strains[113] offers great opportunity for elevated profits and sustainability of relevant industries without significant capital outlay. Current flask culture techniques require large numbers of flasks, bulky shaking beds, large fluid volumes, intensive human labor and expensive equipment, and thus cause poor screening efficiency. Microfluidic chips bring the opportunity to enhance the efficiency of these tests and to reduce the time to market.

The potential of miniaturization for all these applications depends on the hypothesis that experiments performed at the level of a single drop will give the

same response as those performed at a macroscopic scale. The answer is not obvious since culture conditions may vary with time at the macroscopic scale and differ from those at the microscale.

In this work, to address this question, we investigate the impact of the incubator scale on the growth of bacteria populations. We grow bacteria in incubators with volumes ranging from 0.1 μL to 100 mL. We study the growth of two different microorganisms: *Escherichia Coli* (Gram -, motile) and *Staphylococcus aureus* (Gram+, non-motile). We observe a clear dependence of the growth curves on incubator size: the smaller the size of the incubator, the higher the growth rate and the plateau population. The plateau population varies of a factor 10 and the growth rate of a factor 2. We link this increased growth to an improved oxygen supply in the smaller incubators due to the proximity of the bacteria to the exchange surface.

A mathematical model taking into account the oxygen diffusion, consumption, and population growth is developed to capture the experimental data.

The first part of this article describes the experimental conditions. The second part presents the experimental results. The mathematical model is presented in the third part and the last part is devoted to the comparison between the model and the experimental growth curves. Finally we conclude by discussing the potential impact of this study on bioprocesses and on the use of microfluidic techniques.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Microorganisms

A motile gram negative *Escherichia Coli* strain M4100-YFP[72, 114] and a non-motile gram positive *Staphylococcus aureus* (CIP 65.8T) were respectively grown in LB (Luria Broth - BD Diagnostics Systems) at 15.5 g/L and in TSB (Tryptic Soy Broth - BD Diagnostics Systems) at 30 g/L. The temperature was set at 30°C. Both microorganisms were plated on NA (Nutrient Agar - BD Diagnostics Systems) for petri dish counting after serial dilutions in Ringer solutions

(VWR). All inoculations were performed by diluting a 1 mL cryotube of a stationary phase population of the chosen microorganism in a 100 mL Erlenmeyer flask containing the appropriate medium, followed by a second dilution of 1 mL of the obtained culture in another 100 mL Erlenmeyer flask containing the same appropriate medium. This resulted in a 10^4 -fold dilution of the frozen stationary phase population. For each experiment, the inoculum was sampled at this point and injected in the incubator.

3.3.2 Setups

In order to explore incubator sizes of several orders of magnitude, various experimental methods were used (Figure 3.1). Each setup gave access to a range of sizes, gas transfer efficiencies, gas quantities, etc... As gas exchanges (oxygen, carbon dioxide, ...) are well-known growth-controlling parameters, we expect to observe differences in growth by exploring several setup scales, ranging from highly heterogeneous gas distributions within the medium for large incubators, to homogeneous distributions for very small incubators where diffusion is efficient. The conditions corresponding to each incubator type are described hereafter.

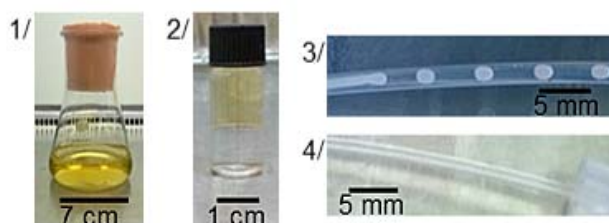


FIGURE 3.1: Photographs of the incubators used in this study. Incubator 1/ is a 100 mL Erlenmeyer flask with a porous cap, incubator 2/ is a 9 mL sealed vial, incubator 3/ corresponds to 5 μ L droplets either in permeable or sealed tube and finally, incubator 4/ to 1 μ L droplets in permeable tube.

The first incubator (incubator 1/) used in this study is a 250 mL glass Erlenmeyer flask, filled with 100 mL of medium (4 cm height). Topped with a porous

cap, it allows free gas exchange between the surrounding environment and the air-liquid interface of the culture. Mixing in the flask is performed using an incubated orbital shaker, allowing convection within the medium.

Glass vials of 9 mL volume (incubator 2/) were used to grow bacteria at a scale close to the Erlenmeyer flask but with more controlled gas exchanges conditions. The hermetic screw-cap were used to seal the vials from the outside environment. If the vial is filled with only growth medium we have zero-flux conditions. If however a mixture of medium and fluorinated oil (non-miscible) is used, a finite quantity of oxygen is available for bacterial consumption. Conversely, a finite oil volume is available for the capture of rejected carbon dioxide. These quantities is defined by the ratio of the phases and the solubility of the gas in those phases. No mixing is applied to this kind of incubator, which means that diffusion transports the gas in the direction perpendicular to the interface. However, the vials are rotated slowly around their vertical axis in order to prevent biofilm formation. Depending on the chosen medium-oil ratio, culture volumes ranged from 1 mL to 9 mL (heights from 0.8 cm to 7 cm). The quantity of oxygen available is determined by the following simple formula: $Q_{gas}^{avail} = V_{aq}x[gas]_{aq}^{equil} + V_{oil}x[gas]_{oil}^{equil}$, and for the quantity of carbon dioxide that can be stored: $Q_{gas}^{stor} = V_{aq}x[gas]_{aq}^{equil} + V_{oil}x[gas]_{oil}^{equil}$. For example, oxygen concentrations at ambient pressure and temperature are $[O_2]_{aq}^{equil} = 7.5$ mg/L, and $[O_2]_{oil}^{equil} = 500$ mg/L. This gives a range in the quantity of oxygen available of $0.0675 \text{ mg} \leq Q_{O_2}^{avail} \leq 4.0075 \text{ mg}$.

Incubators of smaller scale (incubator 3/) are made using PFA (PerFluoroAlkoxy) tubing of 2,18 mm internal diameter ($\times 3$, 18 mm outside diameter). Droplets of inoculated medium are generated in these tubes by co-flowing medium and fluorinated oil. Each droplet plays the role of a spherical incubator of 1.1 mm radius and 5 μL volume, separated from the other droplets by oil. The tubes are made of material which is permeable to oxygen and carbon dioxide at the timescale of a bacterial growth and thus gas can be supplied and evacuated without limit. However, in order to change the experimental conditions, tubes can be covered by an airtight aluminum adhesive tape, which limits the gas exchange to aqueous-oil interface. The exchange conditions in this configuration is defined in the same way as for the sealed vials, mainly controlled by the volume ratio between aqueous and oil phases.

Finally, the smallest incubators are PFA micro-tubes (incubator 4/) of 250 μm internal diameter ($\times 1$, 6 mm outside diameter). The micro-droplets generated in

this tubes adopt a cylindrical shape of $125 \mu\text{m}$ radius and 3 cm long which corresponds to a $1 \mu\text{L}$ volume. Again, the tubing's material allows gas exchange along the entire length of the cylinder-like micro-droplet.

We can see from the previous descriptions that each incubator has a particular symmetry with respect to the gas diffusion direction. The Erlenmeyer flasks and the glass vials present a flat interface from which gases diffuse towards the opposite sealed wall of the incubator. Thus, dissolved gas profiles are homogeneous in the plane perpendicular to the interface and the bacteria population, oxygen and nutrient concentrations depend only upon the position x from the incubator bottom.

Similar symmetry considerations suggest that the bacteria population, oxygen and nutrient concentrations depend only upon the position ρ from the droplet center (spherical symmetry) or upon the position R from the symmetrical axis of the micro-droplets (cylindrical symmetry). We also note that all inoculations correspond to 10^5 bacteria per milliliter, which assures a reasonable number of microorganisms per incubator, even in the smallest droplets. Figure 3.2 summarizes the growth conditions in the various incubators.

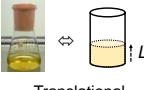

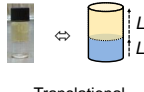

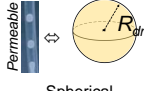

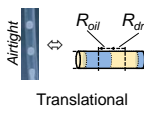

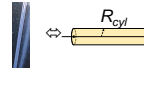

Incubator & Symbol	Experimental design & Symmetry	Conditions	Medium volume \ Initial bact. number	Gases amount
1/ Erlenmeyer ●	 Translational	 Open exchanges $L = 4\text{cm}$ No flux	100 mL 10^7 UFC	Unlimited
2/ Vial ◆	 Translational	 No flux $L = 0,8 \text{ to } 7\text{cm}$ $L_{oil} = 6,2 \text{ to } 0\text{cm}$ No flux	1 to 9 mL 10^{5-6} UFC	Finite
3/ Droplet ▲	 Spherical	 Open exchanges $R_{drop} = 1,1\text{mm}$ No flux	5 μL 10^{2-3} UFC	Unlimited
3/ Droplet ▲	 Translational	 No flux $R_{drop} = 1,1\text{mm}$ $R_{oil} = 1,1 \text{ to } 2,5\text{mm}$ No flux	5 μL 10^{2-3} UFC	Finite
4/ Micro-droplet ★	 Cylindrical	 Open exchanges $R_{cyl} = 125\mu\text{m}$ No flux	1 μL 10^2 UFC	Unlimited

FIGURE 3.2: Description of the symbols, geometries, exchange conditions and sizes associated with each incubator used in this study.

To count the bacteria population, we perform serial dilutions of the samples, which are then plated on Petri dishes for Colony Forming Units (CFU) counting. This allows a quantitative, robust enumeration of the viable cells at regular time intervals. The sampling protocol is adapted to each incubator type. For a single population growth experiment in an Erlenmeyer flask, 1 mL samples are regularly taken directly from an individual flask. However, sequential sampling cannot be performed on a single sealed vial without changing the gas exchange conditions. Therefore, each counting time requires an individual vial from which a unique sample is taken. Growth in droplets are performed in 30 cm long tubes containing many droplets (typically 30 spherical droplets for the 2 mm diameter tubes and 5 cylindrical droplets for the 250 μm diameter ones). For each counting time, an entire tube is emptied for dilutions and plating.

3.4 Experimental observations

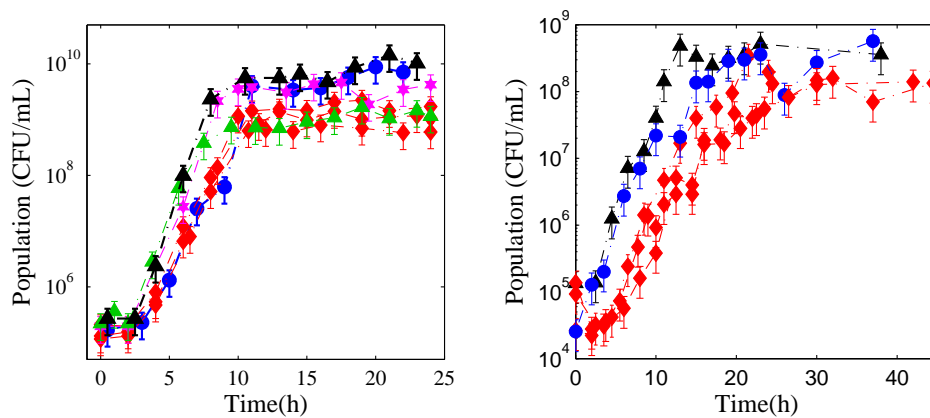


FIGURE 3.3: Growth curves of *Escherichia coli* (Top) and of *Staphylococcus aureus* (Bottom) for various incubation conditions

Growth curves of *Escherichia coli* and of *Staphylococcus aureus* for various growing conditions are shown in Figure 3.3. These curves display the averaged population in the reactor as a function of time. We underline that our measurements are global and do not probe spatial heterogeneities of growth. The growth curves are all different but they share some common features. They display three zones. Initially, the bacteria number remains constant during a lag phase (shorter than 4 hours in all situations). This period is followed by an exponential growth of the bacteria population. After the growth period, the population of living bacteria

reaches a constant value. To characterize the mode of growing, we will extract two parameters from these curves: the stationary population and the growth rate during the exponential phase. Both parameters vary as a function of the experimental conditions.

Let us first focus on the stationary population. We note that, depending on the incubator conditions, a factor of 10 can be observed between the lowest and highest populations for both microorganisms. We point out that the microorganism's size and displacements are much smaller than the size of all the incubators. Therefore, variations in the measured stationary populations are not due to the confinement on the scale of the microorganisms themselves. The classical causes of growth limitation are lack of nutrients, accumulation of soluble metabolites (that can be toxic for microorganisms) and bad gas exchanges. In the following we will investigate the importance of each of these factors on growth limitation due to the different incubator conditions.

In order to assess the impact of nutrient availability, we performed growth experiments as a function of media concentrations in Erlenmeyer flasks. figure 3.4 displays the stationary population measured as a function of LB concentration for *Ecoli* (Left) and of TSB concentration for *Saureus* (Right). The growth experiments shown in figure 3.3 were performed at LB concentration of 15.5 g/L for *Escherichia coli* (black arrow on the left graph, Figure 3.4) and thus lie in a zone where nutrients do not limit growth. However, in the case of *Staphylococcus aureus*, the experiments were performed at 30 g/L of TSB (black arrow on the left graph, figure 3.4). In this case nutrients limit growth. This parameter will be taken into account in the following modeling.

When they grow, bacteria consume oxygen and nutrients and produce soluble metabolites and carbon dioxide. Insufficient gas exchanges may create gas concentration gradients (depletion or accumulation) that may locally modify the value of the stationary population. We perform specific experiments to understand whether gas exchanges or the accumulation of metabolites determine the stationary population. We grow *Escherichia coli* in a concentrated LB medium (15.5 g/L) in three different incubator configurations: first, in a sealed vial in the absence of fluorinated oil where no gas exchange can occur (figure 3.5, small diamonds); second, in a sealed vial in the presence of fluorinated oil where the oil

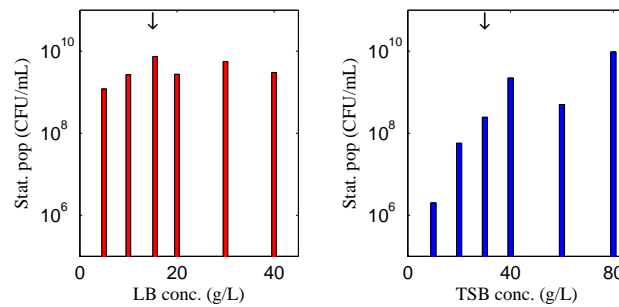


FIGURE 3.4: Stationary phase population of *Escherichia coli* for various concentrations in growth medium (LB) after growth in Incubator 1 for 48h (Left). And Stationary phase population of *Staphylococcus aureus* for various concentrations in growth medium (TSB) after growth in Incubator 1 for 48h (Right). Black arrows show working concentrations.

acts as a limited reservoir for oxygen delivery or for carbon dioxide storage[115] (figure 3.5, large diamonds); and third, in droplets in permeable tubes where gas can be supplied and evacuated without limit (figure 3.5, black triangles). We observe a clear increase in the stationary populations as the size of the gas reservoir increases, as displayed in figure 3.5. After 24 hours, we open the sealed vial containing no oil and permit oxygen to enter and dioxide carbon to get out. The population increases and reaches the value of the droplets incubator. This clearly shows that accumulation of metabolite is not a key factor in our study and that gas exchanges determine the stationary populations.

In order to determine which gas (oxygen or carbon dioxide) is the limiting parameter, we grow *Staphylococcus aureus* in two vials in a concentrated TSB medium at 80 g/L (figure 3.6). The vials are closed with permeable caps allowing gas exchange with the surrounding environment. The first vial is placed in an air atmosphere (figure 3.6, empty green diamond), whereas the second one is placed in a nitrogen atmosphere (figure 3.6, filled green diamond). Thus, both cultures can reject carbon dioxide but only the first one can receive oxygen. The stationary populations for these two samples are displayed in figure 3.6 with, for reference, the black curve corresponding to optimum gas exchange conditions in droplets incubators, and the red curve corresponding to zero gas exchange in sealed vials. The stationary population for the vial in the air atmosphere is 10 times higher than that for the vial in the nitrogen atmosphere. Therefore, in our study, the stationary populations are determined by oxygen availability rather than by insufficient carbon dioxide evacuation.

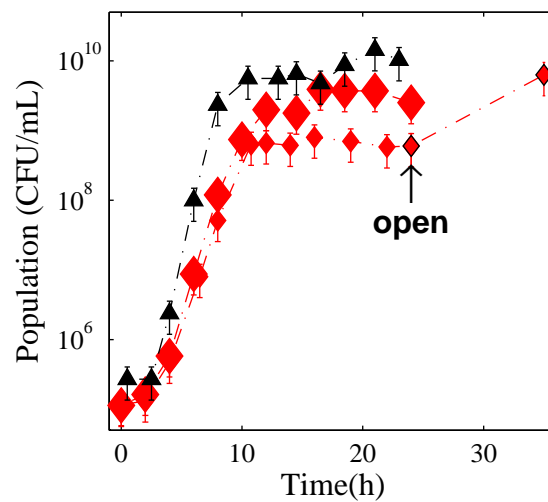


FIGURE 3.5: Growth curves of *Escherichia Coli* in 15.5g/L of LB at 30°C in droplets in permeable tubings (black triangles), sealed vials (small red diamonds) and sealed vials containing 77% volume of fluorinated oil as gas reservoir (large red diamonds). The small red diamonds with dark edges corresponds to population measured in the sealed vial after allowing gas exchanges by replacing its airtight cap by a permeable one.

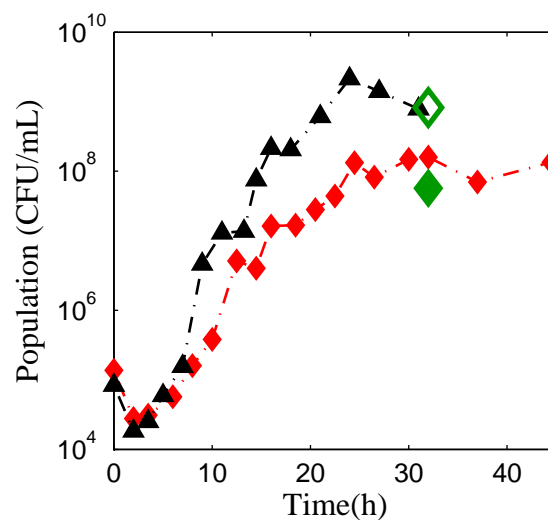


FIGURE 3.6: Growth curves of *Staphylococcus aureus* in 80 g/L of TSB at 30°C in droplets (black triangles) and sealed vials (red diamonds). The empty green diamond is the population measured in an opened vial surrounded by air, whereas the filled green diamond is the population measured in the same conditions but with an exclusive nitrogen surrounding gas. Black and red curves are shown as references of, respectively, optimum gas exchanges conditions in droplets, and impossible gas exchanges in sealed vials

Interestingly, closer inspection of the colonies on Petri dishes issued from populations grown under air or nitrogen atmospheres reveal different aspects (figure 3.7). Specifically, colonies issued from a nitrogen atmosphere show a clearly defined boundary, whereas those issued from an air atmosphere are more diffuse. This reflects the adaptation of bacteria to their environment through phenotypic differentiation. A phenotype corresponds to all the observable properties of a cell at a given time and in a given environment. Bacteria possess a set of tools that give them this adaptability[69]. First, one might hypothesize that a non-genetic adaptation is the source of the differentiation. Indeed, the regulatory systems of bacteria can trigger or prevent genes expressions according to the environment[116, 117], in order to improve its development. However, this regulation is homogeneous in a population and is not hereditary. Thus, differences in the regulation that could appear during growth with or without oxygen should disappear after plating in standard air conditions. Conversely, a genetic adaptation would be transmitted during replications and therefore could explain the different aspects of the colonies. Genetic mutations are the results of errors during the replication of DNA. They can be spontaneous or induced by environmental factors but are always very rare (probability of mutation during replication of *Escherichia coli*: 10^{-4} and probability of mutation on an expressed gene during replication of *Escherichia coli*: 10^{-7}). Another genetic modification, phase variation[118, 119], is more frequent and thus more likely to trigger phenotypic differentiation. Simple chemical modifications of DNA during the cell life (like methylations) can produce a strong diversity within a population. The modification is reversible, but reversible transitions only occur between 10^{-2} and 10^{-4} times per cell per division. Phase variation allows diversification at short time scales, as well as hereditary transmission of the modification. Under stress (lack of oxygen for example), a phase variation can be favored and lead to phenotypic differentiation.

Returning to our previous results, where we observed significant variations of the growth rates and stationary populations depending on the incubator conditions (figure 3.3), we propose phase variation as an interpretation of the growth behavior differentiation. An oxygen-rich environment would favor a fast growing phenotype reaching high stationary populations whereas low-oxygen conditions would result in a slowly growing phenotype with lower stationary populations. Heterogenous oxygen concentrations could allow co-existence of phenotypes and explain the gradients in growth rates and stationary populations.

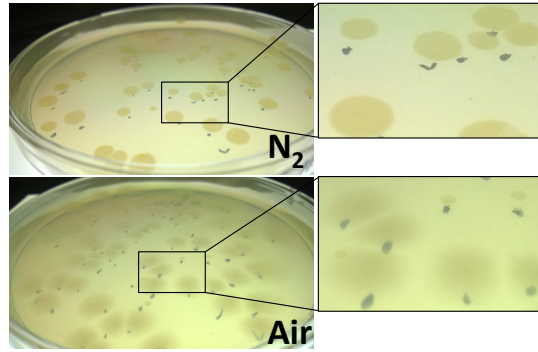


FIGURE 3.7: Pictures taken from the Petri dish plating of samples of cultures of *Saureus* after growth in nitrogen atmosphere (top) and air atmosphere (bottom). Black dots are simply inkmarks used to identify individual colonies.

In the following, we will assume that the growth rate depends only on the local amount of oxygen. We recall that in all our experiments there is no mixing, gas exchanges occur only through diffusion. The characteristic diffusion time is defined as $t_{diff} = \frac{R^2}{D}$ where R is the size of the reactor and D the diffusion coefficient. For droplet incubators, R is very small and thus oxygen which is consumed by bacteria is regenerated very rapidly by diffusion ($t_{diff}=10$ min). In contrast, in Erlenmeyer flasks and vials, R is much larger and t_{diff} can reach 200 hours, leading to a lower growth rate.

To model our experiments, we assume that the growth rate depends on the local amount of oxygen, as described above, and that the stationary population depends on the local amount of oxygen and nutrients.

3.5 Model

3.5.1 Model definition

Experimental data suggest that the exponential growth rate and the stationary phase population are determined by the quality of exchange between the bulk and the oxygen reservoir, and by the amount of nutrient available. To capture this process, we write a model of growth kinetics and growth inhibition based on oxygen and nutrient local concentrations. Temperature and pressure were maintained constant for all experiments, and are thus not taken into account in the following.

To match our experimental observations (figure 3.7), and for the sake of simplicity, we will assume that the co-existence of only two phenotypes of the bacteria are responsible for the different behaviors: an anaerobic and an aerobic one. The overall bacteria population P is then given by the sum of the anaerobic and aerobic populations. We write $P = P^{ana} \delta O_2 + P^{aero} (1 - \delta O_2)$ where δ is a function of the local amount of oxygen, equal to one where $O_2 = 0$ and to zero elsewhere.

Bacteria size is over $1 \mu m$, we thus neglect its diffusion and we write the rate of change in population as follows:

$$\frac{\partial P^{ana}}{\partial t} = \mu_{ana} Ho(t - t_{lag}) H_1(P_{max}^{ana}) H_2(N) P^{ana} \quad (3.1)$$

$$\frac{\partial P^{aero}}{\partial t} = \mu_{aero} Ho(t - t_{lag}) H_1(P_{max}^{aero}) H_2(N) P^{aero} \quad (3.2)$$

$Ho(t - t_{lag})$ is a heaviside function equal to 0 while time "t" is inferior to the adjustable value "t_{lag}" and equal to one otherwise. This corresponds to the lag phase where microorganisms live but do not replicate. $H_1(P_{max})$ is a heaviside step function, equal to zero for $P > P_{max}$ and to one for $P < P_{max}$. The rate of change of the overall population P is:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{\partial P^{ana}}{\partial t} \delta O_2 + \frac{\partial P^{aero}}{\partial t} (1 - \delta O_2) \quad (3.3)$$

And combination of equations 3.1, 3.2 and 3.3 results in:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P}{\partial t} = & [\mu_{ana} Ho(t - t_{lag}) H_1(P_{max}^{ana}) H_2(N) P^{ana}] \delta O_2 \\ & + [\mu_{aero} Ho(t - t_{lag}) H_1(P_{max}^{aero}) H_2(N) P^{aero}] (1 - \delta O_2) \end{aligned} \quad (3.4)$$

This leads to:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P}{\partial t} = & [\mu_{ana} H_1(P_{max}^{ana}) \delta O_2 \\ & + \mu_{aero} H_1(P_{max}^{aero}) (1 - \delta O_2)] H_0(t - t_{lag}) H_2(N) P \end{aligned} \quad (3.5)$$

This equation is very crude and specific to the "two phenotypes" situation of our experiments. To extend the model applications, we take into account the possible dependence of μ_{aero} and P_{max}^{aero} on oxygen. To do so, we modify this expression for a more generic equation:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \mu H_1(P_{max}(O_2)) H_0(t - t_{lag}) H_2(N) P \quad (3.6)$$

With:

$$\mu = \mu_{min} + \gamma O_2^\alpha \quad (3.7)$$

Where μ_{min} is the minimal (=low-oxygen) specific growth rate and α a factor reflecting the metabolism of the microorganism towards oxygen. γ corresponds to the accessible range of growth rates determined as the difference between the optimum growth rate (μ_{max}) and the minimum one (μ_{min}):

$$\gamma = \mu_{max} - \mu_{min} \quad (3.8)$$

And:

$$P_{max} = P_{max}^{aero} - [(P_{max}^{aero} - P_{max}^{ana}) (1 - \frac{1}{1 + e^{-10(O_2 - O_2^c)}})] \quad (3.9)$$

P_{max}^{aero} and P_{max}^{ana} being the maximum stationary population reached respectively in aerobic and low-oxygen conditions (simplified as anaerobic conditions). O_2^c corresponds to the critical value of oxygen concentration below which it becomes growth-limiting. Figure 3.8 shows the P_{max} profile for oxygen concentrations ranging from 0 to the saturation value O_2^* .

The oxygen concentration field follows a diffusion reaction equation in the water phase:

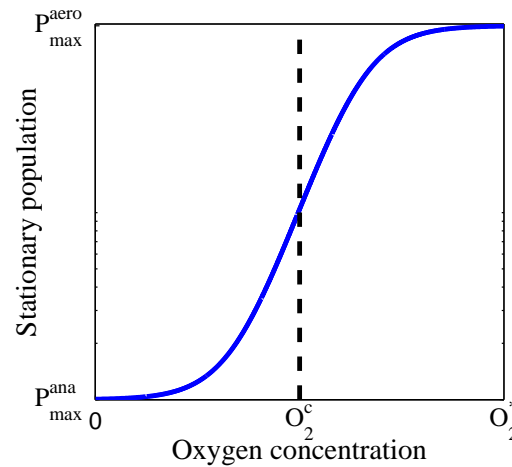


FIGURE 3.8: Profile of stationary population P_{max} as a function of oxygen concentration. Oxygen critical value O_2^c and minimum P_{max}^{ana} and maximum P_{max}^{aero} stationary populations corresponds to fitting parameters and depend on the microorganism.

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = D_{O_2}^w \Delta O_2 + J(O_2) H_1(P_{max}) P \quad (3.10)$$

$D_{O_2}^w$ is the oxygen diffusion coefficient in water, Δ is the Laplacian operator. $J(O_2)$ is a function regulating oxygen consumption. The expression for $J(O_2)$ is given hereafter:

$$J(O_2) = \frac{\log(1 + \frac{O_2}{O_2^*})}{\log(2)} V_{O_2} \quad (3.11)$$

V_{O_2} being the reference consumption value of oxygen by one bacterium per time unit. We recall that the choice of a logarithmic function for J or an oxygen power law function in the expression of μ are phenomenological. We anticipate that these dependences have little or no influence on the final results. In the oil phase, the oxygen concentration field also follows a diffusion equation but without consumption terms:

$$\frac{\partial O_2^o}{\partial t} = D_{O_2}^o \Delta O_2^o \quad (3.12)$$

$D_{O_2}^o$ is the oxygen diffusion coefficient in oil and O_2^o is the oxygen concentration in the oil. Finally, we include the following equation in the model to take

into account the diffusion/consumption of nutrients:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D_N^w \Delta N + K(N) P \quad (3.13)$$

With D_N^w the nutrient diffusion coefficient in water and:

$$K(N) = V_N H_1(P_{max}) H_2(N) P \quad (3.14)$$

V_N being the uptake rate of nutrients by one bacterium.

In the following, O_2^{*w} , O_2^{*o} , $D_{O_2}^w$, $D_{O_2}^o$, D_N^w , and D_N^o are fixed parameters for all calculations. α , O_2^c , V_{O_2} , V_N , μ_{min} , μ_{max} , N^0 , $P_{max}^{aerobic}$, and $P_{max}^{anaerobic}$ are fitting parameters. Among them, μ_{min} , μ_{max} , N^0 , $P_{max}^{aerobic}$, and $P_{max}^{anaerobic}$ are microorganism dependent and can be easily extracted from the experimental results.

This set of equation has to be supplemented by boundary and initial conditions that depend upon the incubator. The next sub-section presents the boundary conditions for one kind of incubator. Boundary conditions and Laplacian operator writing for other incubators are described in the appendix section for the sake of clarity.

3.5.2 Boundary conditions

In incubator 1 (Erlenmeyer flasks), the concentration fields are homogeneous in the planes parallel to the exchange surface. They only vary along the x direction that is perpendicular to the exchange surface. Boundary conditions must be defined at the air/medium interface as well as at the bottom of the flask (glass/medium interface). We assume that the oxygen concentration remains constant in the air close to the interface ($x=L$) and thus, equal to its solubility value in water on the exchange interface. On the glass/medium interface (sealed, $x=0$) we apply a zero flux boundary condition. As microorganisms and nutrients remain in water, we also apply a zero flux boundary condition for the bacteria population and nutrient concentration for each side of the geometry. We write :

$$\frac{\partial P}{\partial x}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial O_2}{\partial x}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial N}{\partial x}(t, 0) = 0, \quad (3.15)$$

for $x = 0$

$$\frac{\partial P}{\partial x}(t, L) = 0, \quad O_2(t, L) = O_2^*, \quad \frac{\partial N}{\partial x}(t, L) = 0, \quad (3.16)$$

for $x = L$

The initial conditions are

$$P(0, x) = P_{ini}, \quad O_2(0, x) = O_2^*, \quad N(0, x) = N_{ini} \quad (3.17)$$

P_{ini} and N_{ini} are respectively the inoculum value and the initial concentration of nutrient in the medium. The various growth conditions described here and in the appendix have already been summarized in figure 3.2.

3.6 Results and Discussions

PDEs resolution returns values of the variables for each time and space point. Figures 3.9 to 3.11 display profiles of population, oxygen, and nutrients associated with the configuration described in each top left graph. The Table 3.1 lists the common parameters used for these resolutions.

Figure 3.9 shows an example of population, oxygen, and nutrient profiles obtained after PDEs resolution. We can see from the figure the heterogeneities between the interface (Space = 0.04m) and the closed end of the vial (Space = 0.00m). The development of such heterogeneities depends on the size and the quality of exchange of incubators.

Figure 3.10 displays the population, oxygen and nutrients profiles obtained in droplets. As diffusion is fast at small scale, no significant heterogeneities appear in such situation. Growth occurs in aerobic conditions and stops when the population reaches 6.10^9 bacteria/mL.

Parameters	Value
O_2^{*w}	7.5 mg/L
O_2^{*o}	500 mg/L
$D_{O_2}^w$	$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
$D_{O_2}^o$	$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
D_N^w	$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
D_N^o	0 m^2/s
μ_{min}	0.17 h^{-1}
μ_{max}	0.35 h^{-1}
α	0.5
N^0	30 g/L
O_2^c	4.9 mg/L
V_{O_2}	$-5.10^{-7} \frac{\text{mg}}{\text{h.UFC}}$
V_N	$5.10^{-10} \frac{\text{mg}}{\text{h.UFC}}$
$P_{aerobic}_{max}$	1.10^{10} UFC/mL
$P_{anaerobic}_{max}$	1.10^8 UFC/mL

TABLEAU 3.1: Reference values of the model parameters used for the illustrative results presentation in figures 3.9 to 3.11.

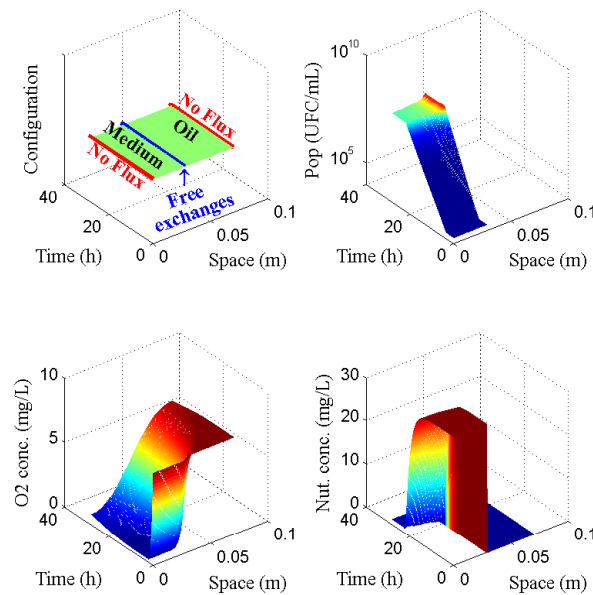


FIGURE 3.9: Results obtained by model resolution in the biphasic case (vial with a ratio medium:oil of 4:3). The top left graph presents the configuration and boundary conditions used for the calculations. Top right graph shows the population field in the aqueous phase of the incubator. Bottom left graph displays the oxygen concentration field, and bottom right graph corresponds to the nutrient concentration field. Population and oxygen profiles evidence the apparition of heterogeneities within the medium in this biphasic case.

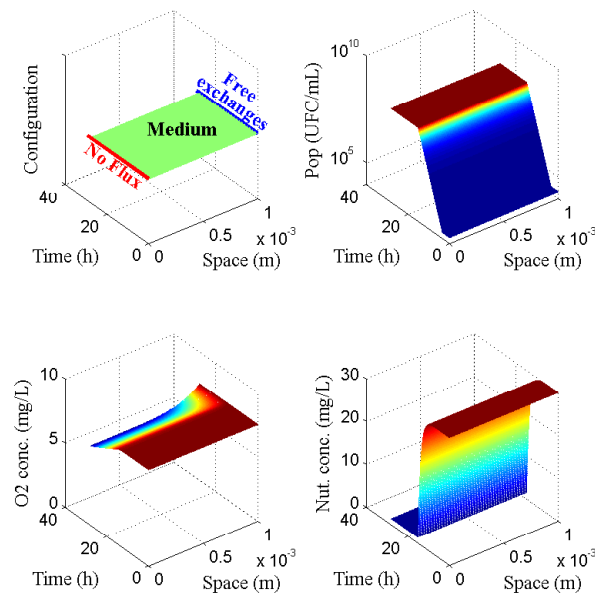


FIGURE 3.10: Results obtained by model resolution in the droplet case ($5 \mu\text{L}$ droplet in a permeable tube). The top left graph presents the configuration and boundary conditions used for the calculations. Top right graph shows the population field in the incubator. Bottom left graph displays the oxygen concentration field, and bottom right graph corresponds to the nutrient concentration field. Even though a weak gradient appear in the oxygen field, we can notice from these graphs that the whole medium can be considered as homogeneous during growth.

Figure 3.11 shows population profiles obtained by numerical resolution of the PDEs in conditions corresponding to a sealed vial (Incubator 2) containing four different ratios of medium:oil. The top left graph shows that, as expected, in a completely sealed incubator with no gas reservoir, everything remains homogeneous within the medium. This situation looks like the one encountered in the droplets. In fact, it is just the opposite. The growth occurs in low-oxygen conditions and with no possible supply. A careful analysis of the curves points out that the kinetic of growth is slower than in the droplets situation and that the growth stops when the population reaches 6.10^8 bacteria/mL (ten times lower than in the droplet case). The other graphs correspond to vials in presence of oil. We recall that oil acts as a reservoir for oxygen. In these situations, heterogeneities appear as a function of time. Close to the bottom of the vial, oxygen is consumed and diffusion at large scale is not sufficient to replenish it. As a consequence, bacteria

Parameters	Value
O_2^{*w}	7.5 mg/L
O_2^{*o}	500 mg/L
$D_{O_2}^w$	$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
$D_{O_2}^o$	$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
D_N^w	$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
D_N^o	$0 \text{ m}^2/\text{s}$

TABLEAU 3.2: Fixed parameters values used for the comparison between experiments and modeling of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growths.

grow in low-oxygen conditions. On the opposite, near the exchange interface, oxygen is replenished by diffusion and bacteria grow in aerobic conditions. They grow faster and reach a higher stationary population. This numerical result matches experimental observations where higher optical densities were found close to interfaces.

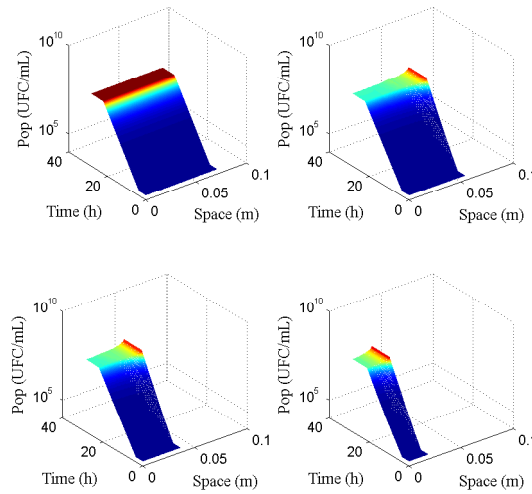


FIGURE 3.11: Results obtained by model resolution in the incubator 2/ case (vial with a variable ratio medium:oil). Top left graph shows the population field for a ratio medium:oil of 1:0. Top right graph presents the population in the aqueous phase of the incubator for a ratio 6:1, bottom left graph for a ratio of 4:3, and bottom right graph corresponds to a ratio 2:5. The profile in the absence of oil shows that the medium remains homogeneous in the absence of gas reservoir. When oil can supply oxygen (three other graphs), growth is improved in a small layer close from the interface where diffusion is efficient.

Constant parameters through all calculations are shown in Table 3.2.

Parameter	Value for <i>E.coli</i>	Value for <i>S.aureus</i>
μ_{min}	0.35 h^{-1}	0.17 h^{-1}
μ_{max}	0.75 h^{-1}	0.35 h^{-1}
α	1	0.5
N^0	15 g/L	30 g/L
O_2^c	3 mg/L	4.9 mg/L
V_{O_2}	$-5.10^{-10} \frac{mg}{h.UFC}$	$-5.10^{-7} \frac{mg}{h.UFC}$
V_N	too weak to assess	$5.10^{-10} \frac{mg}{h.UFC}$
$P_{max}^{Paerobic}$	6.10^9 UFC/mL	1.10^{10} UFC/mL
$P_{max}^{Panaerobic}$	6.10^8 UFC/mL	1.10^8 UFC/mL

TABLEAU 3.3: Fitting parameters values used for the comparison between experiments and modeling of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growths

From the population profiles, we extract the mean population value over the sample length for each time step. This parameter corresponds to the experimental population counting (sampling performed after homogenization) and can therefore be compared to the experimental data.

The model validation by comparison with experimental results is displayed in Figure 3.12 for *E.coli* and in Figure 3.13 for *S.aureus*. The incubator 1 (Erlenmeyer flask) is not included in this comparison because convection is not taken into account in our model. The Table 3.3 presents the values used for each microorganism-dependent parameter in the numerical resolutions for *E.coli* and *S.aureus*. Incubator configuration (figure 3.2), initial population and lag time are specific to each experiment. The values are thus adjusted for each calculation in order to match the corresponding experimental conditions.

The top graph of Figure 3.12 reveals a very good agreement between the model and the experimental data. The black and magenta curves correspond to homogeneous conditions with no limit in the quantity of exchanged gases. They are obtained in droplets and micro-droplets, where these conditions allow to reach high growth rate and high stationary population. Indeed, at this scale, diffusion is efficient enough to provide oxygen to the bacteria all over the sample. The green data exhibit the limitation that can appear from finite gases reservoirs. The droplets generated in airtight tubings leading to these data are homogeneous thanks to diffusion, but limited in oxygen supply quantity by the ratio medium:oil in the tubing. Therefore, oxygen supply during most of the growth is sufficient to reach a high growth rate, but the reservoir comes to its end before the highest stationary population is reached.

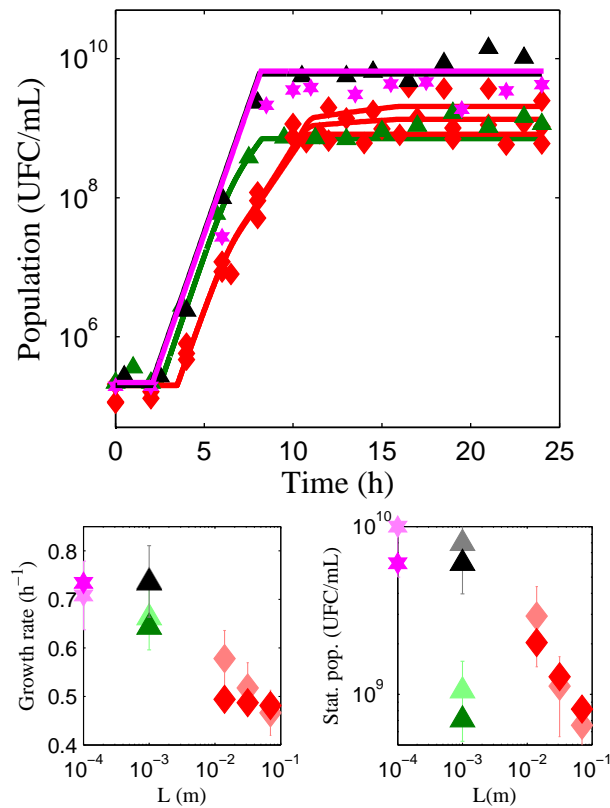


FIGURE 3.12: Comparison between experimental and model results for *Escherichia coli*. Top graph represents the global growth curves obtained from experiments (discrete symbols) and from the corresponding calculations (solid lines). Red data corresponds to growth in incubator 2 (vial), black data to growth in incubator 3 (droplets in permeable tubes), green data to growth in the airtight incubator 3 (droplets in airtight tubes), and magenta data corresponds to growth in incubator 4 (micro-droplets in permeable tubes). Left bottom graph sums up the growth rates measured for each growth configuration as a function of the characteristic length of the incubators. Faint symbols represent the experimental data and bright symbols correspond to the data extracted from the modelings. Right bottom graph uses the same nomenclature to present the stationary phase populations versus the characteristic length of the incubators.

To go deeper into the analysis, we extracted growth rates (maximal slope in the exponential phase) and stationary phase populations (mean population in stationary phase) from these curves to plot it versus the characteristic length of the incubators (two bottom graphs). Experimental values are shown in faint colors with error-bars estimated from repetitions. Calculated ones are shown on top of it in bright colors. Symbols and colors are kept as described in the Figure 3.2. Consistently with the top graph, we find calculated values to agree with experimental

results for each growth conditions.

The red data evidence the impact of medium:oil ratio in sealed vials. In these incubators, diffusion is not sufficient to provide enough oxygen to bacteria in the whole medium within their division time. Aerobic conditions are thus only found on a thin layer at the interface. The weak increase in growth rate visible on the bottom left graph between the red triangles reflects the ratio of this aerobic layer size over the whole incubator one. The strong improvement in growth rate from the red to the black, green and magenta data exhibits the crossing of the efficient diffusion characteristic length when reducing the parameter "L" below 1 mm. As well as in the airtight tubing case, the impact of the oxygen reservoir size on stationary population clearly appears with these data. The bottom right graph emphasizes this observation.

The Figure 3.13 presents the comparison of model and experiments in the case of *S.aureus*. The empty symbols and dot-dashed lines correspond to culture with 80 g/L of TSB growth medium instead of 30 g/L. We find here again a very good agreement between the data and the model. We note that the model captures the shared control of the stationary population between oxygen and nutrients. Indeed, the bright red data, where oil acts as gas reservoir, exhibit a higher stationary phase population in the case of higher nutrient initial concentration, whereas the dark red data, obtained in the same condition but without gas reservoir, show no differences.

Table 3.3 shows the fitting parameters. If compared to the values of *E.coli*, they exhibit a different dependence on oxygen concentration through the parameter α as well as a stronger uptake rate. The dependence on oxygen is visible from the increase in growth rates and stationary populations ranging from the dark red data (vial with no oil) where no exchanges occur, to the bright red (vial with medium:oil ratio of 2:7) where a layer of efficient diffusion partially improves growth conditions in the incubator, and to the optimal conditions (droplets in permeable tubing) of the black data where concentrations fields are homogeneous and exchanges unlimited. The two bottom graphs compare experimental and calculated growth rates and stationary populations versus incubator's characteristic lengths. It makes it obvious that oxygen diffusion efficiency, inversely proportional to the length "L", controls the mean growth rate, whereas the stationary

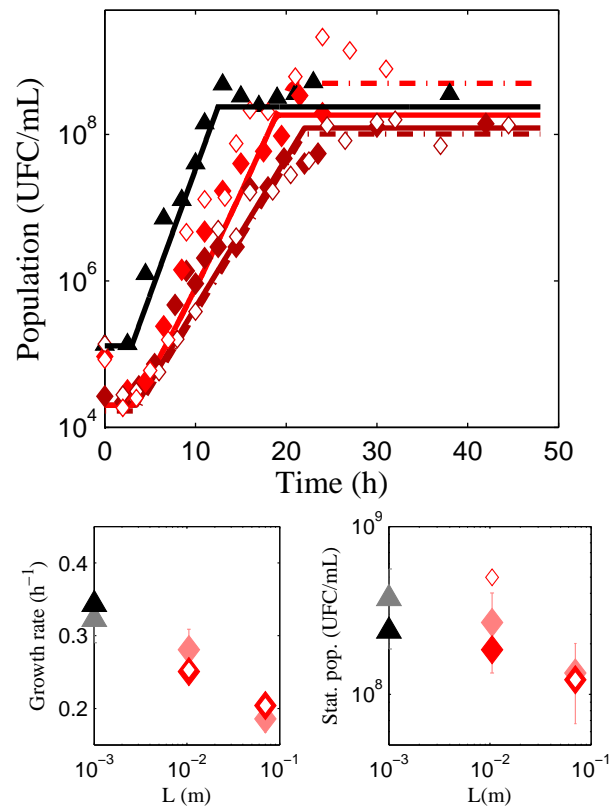


FIGURE 3.13: Comparison between experimental and model results for *Staphylococcus aureus*. Top graph represents the global growth curves obtained from experiments (discrete symbols) and from the corresponding calculations (solid and dot-dashed lines). Red data corresponds to growth in incubator 2 (vial, dark red used for vial without oil for the sake of clarity), black data to growth in incubator 3 (droplets in permeable tubes). The empty symbols and dot-dashed lines corresponds to growth in 80 g/L medium instead of the 30 g/L usually used. Left bottom graph sums up the growth rates measured for each growth configuration as a function of the characteristic length of the incubators. Faint symbols represent the experimental data and bright symbols correspond to the data extracted from the modelings. Right bottom graph uses the same nomenclature to present the stationary phase populations versus the characteristic length of the incubators.

population can be regulated by both the oxygen quantity, and the nutrient initial concentration.

For both microorganisms, we find a good agreement between experimental data and calculated ones. This result proves that complex metabolic behaviors can be simply estimated by identifying the growth-limiting substrates and/or metabolites, and their local concentrations. Then, by growing bacteria in various concentrations fields, we assess their dependence upon the substrates and estimate their

uptake or production rates. Finally, we find in the multi-scale approach a way to determine the best growth conditions for a given microorganism thanks to the possibility to know the key parameters and their optimal ranges.

3.7 Conclusions

After experimental observation of the dependence of bacteria growth upon incubator configurations, we propose a simple explanation based on oxygen diffusion-consumption. According to the quantity of available oxygen and the exchange area between the oxygen supply medium and growth medium, bacteria find themselves in various local oxygen concentrations during growth. Using oxygen in their metabolism, local oxygen concentration differences result in different local growth rates and, in the end, to global growth rate differences that are observed experimentally. We have developed a model that captures the experimental data by taking these local effects into account. We also propose a simplified growth inhibition explanation (growth of two different phenotypes as a function of the oxygen concentration) to extend the prediction of the model to the stationary phase.

The conclusions of this study are twofold. Firstly, we have shown that the culture conditions at the microscale differ from those at the macroscale. Gas exchanges play a major role in the growth of bacteria. In microfluidic and millifluidic environments, the permeability of the incubator materials allow an unlimited oxygen supply by diffusion. Moreover, the efficiency of diffusion at small scales makes the supply instantaneous in comparison with the cell division time. In classical Erlenmeyer flask condition, oxygen is brought by diffusion in air towards the free surface and then by convection into the bulk. This process is less efficient than diffusion at small scales and induces a decrease in the growth rate of the bacteria. However, growth curves in all these configurations show comparable trends. We can then conclude therefore that microfluidics and millifluidics are relevant platforms to perform microorganisms cultures comparable to macroscopic ones. As specified above, the kinetics of growth may vary. Designing miniaturized reactors where gas exchanges are fast is thus a way to intensify bioprocesses.

Secondly, we have shown that the study of growth at various spatial scales allows the understanding and modeling of the growth controlling mechanisms. This approach differs from the seminal work of Monod. In 1949, Monod[6] defined the

required culture conditions to get a precise and quantitative analysis. He recommended that cultures should be constantly homogeneous, in equilibrium with the air phase, and in a medium with constant composition. In this spirit, the introduction of the chemostat by Leo Szilard[120] was a milestone in the field of microbiology. Chemostats facilitate the continuous culture of bacteria, yeast and algae by continuously replenishing a constant volume of fluid to maintain specific concentrations of cells and growth factors. However, in nature (soils, sea water,...), such regular conditions are rarely met. Likewise, in industry, temperature, pressure, pH, oxygen or nutrient content may vary in the bioreactors and become heterogeneous. Still, microorganisms are responsible for numerous beneficial processes such as industrial fermentation, production of alcohol, dairy products, antibiotics, amino-acids. They are used for the biosynthesis of xanthan, aroma, alginate, polysaccharides. It is therefore important to be able to develop models taking into account the heterogeneity of the medium and the convection-diffusion processes. Miniaturization combined with studies at the macroscale opens the road to the design of new kinds of experiments that control the role of gas exchanges and/or nutrients gradients. The models obtained may give access to growth parameters in real heterogeneous conditions instead of returning parameters estimated from homogeneous chemostat studies.

Further studies to understand the role of nutrients gradients or biocides/antibiotics actions following this approach are under way.

3.8 Acknowledgements

The *Escherichia coli* MC4100-YFP strain[72, 114] was obtained from the Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés of ESPCI. We thank Steve Meeker for his attentive proofreading of this manuscript.

POINTS CLÉS DU CHAPITRE:

- Le changement de taille d'incubateur implique une modification des conditions de croissance qui aboutit à des différences de comportement des microorganismes.
- Le taux de croissance en phase exponentielle et la population de la phase stationnaire sont significativement impactés par la réduction d'échelle. Les concentrations locales en oxygène et milieu de culture sont responsables de ces effets.
- Le modèle numérique proposé dans ce chapitre est basé sur les équations de diffusion/consommation de l'oxygène et des nutriments, et sur une loi de croissance fonction de la concentration locale en oxygène. Les courbes de croissances calculées sont en bon accord avec les résultats expérimentaux, et valident l'identification des paramètres clés.
- Le taux de croissance augmente quand la distance caractéristique entre le réservoir d'oxygène et les microorganismes diminue. Quand le temps de diffusion caractéristique de l'oxygène pour couvrir cette distance devient inférieur au temps de division cellulaire, la concentration en oxygène reste maximale et donc le taux de croissance également.
- La population au plateau optimale est obtenue quand les quantités d'oxygène et de nutriments disponibles sont en excès par rapport au besoins des microorganismes. Quand les réserves sont insuffisantes, la croissance s'arrête prématurément.
- La croissance en erlenmeyers permet d'atteindre des populations stationnaire optimales, bien que les cinétiques soient plus lentes qu'en tube. Les croissances en tubes et en erlenmeyers peuvent être considérées comme les plus favorables au développement des microorganismes aérobies facultatifs.
- L'approche combinée de cette étude multi-échelle et de la modélisation numérique offre des possibilités d'applications diverses telles que l'analyse du comportement des microorganismes en environnement hétérogène ou l'optimisation de bioprocédés.

Chapitre 4

Outil haut-débit pour l'évaluation de biocides

Nous avons montré dans les chapitres précédents que les incubateurs fluidiques miniaturisés sont efficaces pour la culture de microorganismes, et étudié les effets de la réduction d'échelle par rapport à des incubateurs classiques. Nous avons également présenté des méthodes de mesure de population en ligne, non-intrusives, quantitatives et rapides. Dans ce chapitre, nous allons expliquer le travail effectué afin de coupler une méthode de mesure en ligne avec les incubateurs millifluidiques pour rendre possible le suivi de croissance haut-débit. Dans un premier temps, nous allons détailler les critères à satisfaire pour un couplage efficace des mini-incubateurs et de la méthode analytique. Puis, nous présenterons le dispositif automatisé mis au point pour rendre les mesures autonomes et atteindre ainsi le haut-débit. Enfin, nous montrerons l'efficacité de ce système pour la détermination de concentration minimale inhibitrice de biocides.

4.1 La mesure de population en gouttes

Les milli-incubateurs présentés dans le chapitre 2 ont montré leur efficacité pour la croissance de microorganismes. Dans le même chapitre, nous avons également détaillé des techniques permettant un suivi de population en ligne satisfaisant aux critères du haut-débit. Nous présentons maintenant comment ces outils ont été couplés afin de permettre un suivi de population en gouttes. Parmi les méthodes analytiques détaillées dans le chapitre 2, la fluorescence corrigée par l'absorbance s'est montrée la plus aisée à mettre en oeuvre. Nous avons donc choisi de coupler les milli-incubateurs avec cette technique plutôt qu'avec le comptage optique. Nous

expliquons en premier lieu les critères optiques à satisfaire pour obtenir des mesures optimales, puis nous précisons la méthodologie à suivre pour que les résultats obtenus soient quantitatifs.

4.1.1 Les critères optiques

Dans le cas de la mesure couplée de fluorescence et d'absorbance, tout comme dans le cas du comptage optique direct, les informations sont acquises par analyse de la lumière après interaction avec le milieu. Il est donc nécessaire d'utiliser des matériaux transparents dans la gamme de longueur d'onde de travail. De plus, étant donné les faibles volumes mis en jeu, les chemins optiques doivent donc être optimaux de façon à éviter la perte de signal. Pour cela, il est nécessaire de limiter au maximum la présence d'interfaces courbées entre deux zones d'indices optiques différents. Les matériaux couramment utilisés en millifluidique et microfluidique présentent des indices très proches de ceux de l'eau et de l'huile fluorée. Ainsi, les interfaces intérieures aux tubes ou puces ne sont pas sources de pertes d'information optique. En revanche, les interfaces externes, avec l'air, peuvent être fortement pénalisantes. Afin d'obtenir un système le plus performant possible d'un point de vue optique, il est nécessaire de rendre les interfaces air/système d'incubation planes. Pour cela, il est possible de corriger des interfaces non-planes à l'aide de fluides correcteurs d'indices, ce qui implique un montage complexe, ou alors de n'utiliser que des interfaces planes.

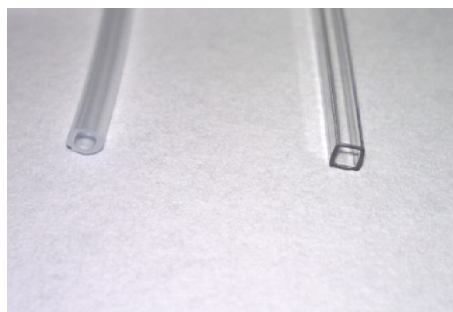


FIGURE 4.1: Capillaires de section circulaire en PFA (PerFluoroAlkyl) et carrée en PC (PolyCarbonate).

Ce critère peut être difficile à satisfaire dans le cas de la millifluidique où les tubes couramment utilisés sont de géométrie cylindrique. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de débiter par un cas simple à mettre en oeuvre mais peu

efficace optiquement en utilisant ce type de capillaires, puis de tester des capillaires de section carré afin d'évaluer l'amélioration du résultat final(Figure 4.1).

4.1.2 L'accès aux mesures quantitatives

L'objectif de ce couplage étant la mesure quantitative de populations présentes dans les gouttes, il est crucial de pouvoir relier la fluorescence corrigée par absorbance à une concentration en microorganismes. Cependant, certains biais peuvent perturber la mesure et faire perdre le lien entre la mesure et la population. Le premier critère est donc que la manipulation soit effectuée dans un environnement parfaitement contrôlé afin qu'aucune pollution lumineuse ne parvienne jusqu'à l'échantillon. Malgré cela, la fluorescence propre du milieu de culture, le photo-blanchiment, et les bruits électroniques liés au montage peuvent apporter des erreurs. Pour pouvoir identifier ces signaux parasites, une référence contenant du milieu de culture seul, et une autre contenant un milieu transparent non fluorescent doivent également être analysés de la même façon que les échantillons. Ainsi, les mesures de fluorescence-absorbance sur les gouttes de culture peuvent être corrigées par ces références, et le résultat se retrouve affranchi des signaux parasites. Seule la fluorescence-absorbance liée aux microorganismes est alors prise en compte, et reste proportionnelle à leur nombre.

Volume de goutte (L)	Nombre de microorganismes par goutte pour des suspensions à ($\mu\text{Org./mL}$)									
	1	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
10^{-1}	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	10^{11}
10^{-2}	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
10^{-3}	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
10^{-6}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
10^{-9}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	10^1	10^2	10^3

TABLEAU 4.1: Nombre de microorganismes par goutte en fonction de la population moyenne et de la taille de goutte.

Par ailleurs, afin d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus par les méthodes classiques, un paramètre important à prendre en compte dans le cadre de cultures miniaturisées est la gamme de population qu'il est possible de gérer. Dans le Tableau 4.1, le nombre de microorganismes par incubateur est présenté

en fonction du volume de cet incubateur et de la concentration moyenne en microorganismes. On voit alors que pour des volumes d'incubateurs inférieurs au microlitre, il est possible de descendre en dessous de la valeur de 1 microorganisme par incubateur (valeurs en rouge). Dans le cas où la population moyenne en microorganismes est fixe, il est donc primordial de sélectionner une taille d'incubateur adapté pour avoir un nombre suffisant de microorganismes par goutte.

4.2 Description du système automatisé

Dans le contexte technologique décrit dans le paragraphe 1.3.3, et pour répondre à des problématiques industrielles de criblage d'impact de formulations sur les microorganismes, nous avons choisi de mettre au point un système combinant une forte capacité de parallélisation et de statistique, tout en conservant une croissance similaire à celle observée en systèmes classiques et avec des mesures quantitatives de population.

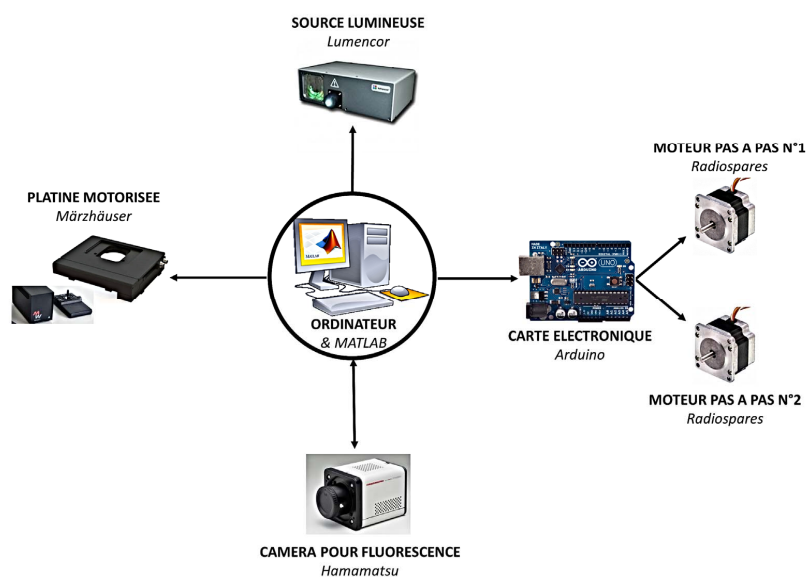


FIGURE 4.2: Schéma d'organisation du contrôle des différents éléments du système automatisé.

Afin de permettre le suivi de culture sur un grand nombre d'échantillons, les étapes de manipulation doivent être évitées. Le passage des incubateurs devant

le détecteur doit donc être automatisé afin de libérer l'opérateur. Pour cela, nous avons conçu un dispositif permettant le support des tubes contenant les incubateurs microfluidiques. Ce support est contenu dans une enceinte thermostatée et peut être mis en rotation afin, d'une part, d'éviter la sédimentation dans les gouttes, et d'autre part, de permettre le passage des tubes devant le système de mesure de fluorescence/absorbance à intervalles de temps réguliers. La platine motorisée supportant l'enceinte permet de scanner toutes les gouttes contenues dans les tubes par déplacement le long de leur axe. Le système de détection couple une source lumineuse, une caméra de fluorescence, des filtres de fluorescence mobiles (pour le passage fluorescence à absorbance et inversement) à un microscope qui permet l'assemblage optique de ces éléments. Les Figures 4.2 et 4.3 montrent la coordination entre les divers éléments ainsi que le montage complet.

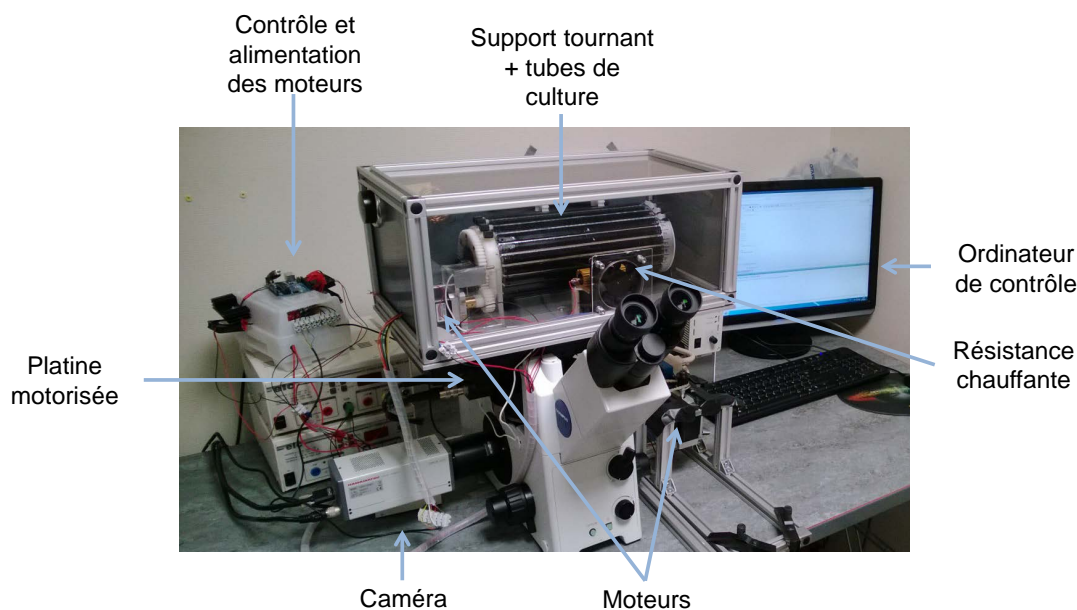


FIGURE 4.3: Photographie du montage de suivi de croissance automatisé.

La préparation des tubes se fait comme présenté dans le chapitre 2. Bien qu'aillant concentré une grande partie des travaux de thèse, les détails techniques de fonctionnement du dispositif sont présentés dans l'annexe B à des fins de clarté.

4.3 Résultats de suivi de croissance automatisé et gain de temps

Le système automatisé décrit dans ce chapitre permet l'acquisition de courbes de croissance de façon haut-débit. Les applications d'un tel système peuvent être diverses. Nous présentons ici le type de résultats obtenu grâce à ce dispositif et les limitations du système. Puis, nous expliquons comment il peut être amélioré afin de repousser ces limitations. Enfin, nous discutons le choix de l'évaluation d'efficacité de biocide retenue comme application pour sa validation en l'état, de façon à exploiter au mieux ses possibilités.

4.3.1 Courbes de croissances automatisées

Le système automatisé a été développé afin de suivre l'évolution de population dans un grand nombre de cultures à la fois. Pour valider son fonctionnement, et avant d'envisager des applications, nous avons étudié des évolutions de population dans des conditions optimales. La Figure 4.4 montre les courbes de croissance obtenues en suivant l'évolution de répliquas d'une culture de *Ecoli* à 30°C dans le milieu LB à 5 g/L. L'inoculation était de 10^6 UFC/mL et des comptages par dilutions et étalements sur boîtes de Pétri ont montré que la population au plateau atteinte est d'environ 10^9 UFC/mL.

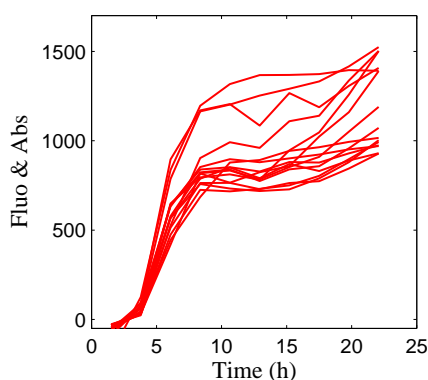


FIGURE 4.4: Courbes de croissance de *Ecoli* dans le LB à 5 g/L acquises par le dispositif automatisé après inoculation à 10^6 UFC/mL, tracées avec un axe des ordonnées en échelle linéaire.

On voit sur la figure que le signal en fin de culture correspond bien à une augmentation d'un facteur 10^3 par rapport au signal initial, ce qui reflète bien la

proportionnalité de la mesure vis-à-vis de la population (qui augmente également d'un facteur 10^3 entre sa valeur d'inoculation et finale).

Les courbes sont ici présentées sur un axe des ordonnées linéaire, contrairement aux courbes de croissance habituelles qui sont souvent présentées sur des axes logarithmiques. Par rapport à une représentation linéaire, l'affichage logarithmique tend à "tasser" les valeurs élevées et "dilater" les plus faibles. Dans le cas de la méthode couplée de fluorescence/absorbance, la mesure est toujours polluée par du bruit (provenant des éléments électroniques et de la fluorescence du milieu, voir paragraphe 4.1.2). Pour des populations importantes (fin de croissance), la part du bruit dans le signal mesuré total est très faible. En revanche, pour des populations faibles (inoculation), le bruit représente une part non négligeable du signal total, et ce malgré les corrections du signal par des références. Ainsi, le tracé des courbes sur un axe logarithmique permet de resserrer l'affichage des populations au plateau, mais met également en avant les fluctuations dues au bruit aux faibles valeurs de populations. La Figure 4.5 montre la partie supérieure des courbes acquises de façon automatisée, tracées sur une échelle logarithmique.

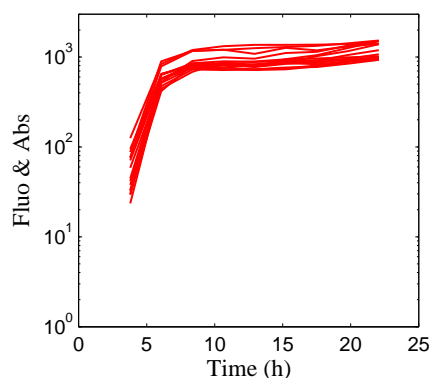


FIGURE 4.5: Courbes de croissance de *E. coli* dans le LB à 5 g/L acquises par le dispositif automatisé après inoculation à 10^6 UFC/mL, tracées avec un axe des ordonnées en échelle logarithmique.

Le manque de précision en début de croissance représente la limitation principale du dispositif. Il existe cependant des solutions qui permettraient d'améliorer cette sensibilité, et c'est ce que nous allons discuter dans le paragraphe suivant. Toutefois, il est important de retenir que le système automatisé permet de suivre des croissances à haut-débit dans une gamme de population d'au moins trois décades, et qu'il peut donner accès aux cinétiques de croissance ainsi qu'à

une importante répétition de chaque mesure. Son utilisation présente donc un réel intérêt pour des applications de type criblage. Nous présentons en fin de cette sous-section l'application choisie pour établir la preuve de fonctionnement du dispositif.

4.3.2 Évolutions et améliorations possibles

Comme présenté dans le paragraphe précédent, la limitation majeure du système automatisé présenté ici est un manque de précision pour les faibles valeurs de populations. Cette incertitude est due au bruit électronique d'une part, et à la fluorescence propre du milieu de culture qui peut masquer celle des bactéries, et qui fluctue au cours du temps.

La correction du bruit électronique se fait de façon satisfaisante à condition d'avoir une référence fiable (milieu sans microorganismes, huile). L'amélioration principale des mesures pourrait donc provenir d'une réduction du bruit dû au milieu. Le remplacement du milieu par un milieu non fluorescent serait idéal car il ferait aussitôt disparaître le besoin de correction de la fluorescence du milieu seul. Cependant, cela implique une restriction des milieux de culture utilisables, et n'est parfois pas possible si les microorganismes ont besoin d'un facteur de croissance particulier qui est fluorescent. Ainsi, la solution qui apparaît comme la plus efficace sans être restrictive est le photo-blanchiment du milieu avant de procéder aux tests. Ce procédé consiste à insoler le milieu par une lumière de longueur d'onde et de puissance convenable pour désactiver la fluorescence. Il fonctionne bien sur des volumes réduits et est, à l'heure actuelle, source d'imprécision pour les mesures car l'illumination utilisée pour mesurer la fluorescence des bactéries provoque un photo-blanchiment progressif du milieu de culture qui doit être ensuite corrigée via une référence. Mais s'il est appliqué en amont de l'inoculation, ce procédé permet d'éviter la présence et les fluctuations d'une fluorescence parasite à celle des bactéries. La difficulté technique qui bloque son utilisation est la capacité à photo-blanchir de façon contrôlée un volume important de milieu de façon stérile (volume nécessaire à la formation de toutes les gouttes d'un test).

Par ailleurs, il est possible d'envisager l'amélioration du dispositif actuel par remplacement de la méthode de comptage. En effet, le comptage microscopique direct présenté dans le chapitre 2 est facilement intégrable au montage actuel et

permet de mesurer des populations de façon quantitative sur une gamme plus importante que la méthode de Fluorescence/Absorbance. De plus, tous les microorganismes planctoniques (qui restent en suspension) de taille supérieure ou égale au micromètre peuvent être analysés, même s'ils ne sont pas fluorescents. Le verrou technique qui a bloqué l'utilisation de cette méthode sur le dispositif actuel est la quantité de données à gérer. Une optimisation de l'acquisition, analyse, stockage des images acquises permettrait de l'utiliser pour améliorer le dispositif actuel.

4.3.3 Applicabilité de la méthode

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de microbiologistes de Solvay, l'objectif du développement d'un dispositif de suivi de croissance haut-débit a pour but l'étude d'efficacité des biocides utilisés en milieu industriel (définis dans la section 4.4.1). Ces tests peuvent concerner des produits finis dont il s'agit de vérifier ou d'optimiser la protection anti-microbienne, ou alors des molécules dont l'effet biocide n'est pas encore connu pour évaluer leur potentiel en tant qu'agent conservateur.

Le premier type de test est appelé "Challenge Test" et est soumis à diverses normes selon le domaine d'application[25](NF T 75-611, pharmacopée européenne 7.0 EP 5.1.3, pharmacopée US - USP 51, etc...). Dans leur très grande majorité, ces essais doivent être réalisés sur une durée de 15 jours à 1 mois, avec seulement quelques comptages ponctuels. De plus, dans le cas de vérification de la protection de produits finis, une seule formulation est à tester. Pour ce type d'applications, l'utilisation du dispositif automatisé ne semble pas particulièrement pertinente.

En revanche, dans le cas d'exploration de molécules, chaque test comporte une gamme de concentration à tester (voire gamme de composition de formulations pour la recherche de synergies), et le nombre de molécules candidates peut être illimité. Ainsi, la capacité de réaliser des analyses automatisées sur un grand nombre d'échantillons en simultané présente ici un très fort intérêt. Nous détaillons les caractéristiques de ces tests dans la section suivante.

Nous avons donc choisi d'orienter l'utilisation du dispositif sur les évaluations d'efficacité biocide, et d'en valider le fonctionnement sur deux formulations biocides courantes. Nous présentons ces études dans la section suivante.

4.4 Application au criblage de biocides haut-débit

Développé dans l'objectif de pouvoir évaluer l'impact de molécules ou de formulations de molécules sur le développement de microorganismes, l'outil décrit précédemment s'adapte naturellement aux tests d'efficacité biocide. Les comportements de microorganismes en suspension et en biofilms peuvent être très différents vis-à-vis de l'action des biocides et nous ne nous intéressons ici qu'aux tests d'efficacité sur des microorganismes en suspension. Nous débutons cette partie par une présentation des agents de conservations. Puis nous comparons les résultats expérimentaux obtenus pour la détermination d'efficacité de deux biocides connus par des méthodes classiques et par notre méthode automatisée.

4.4.1 Les agents de conservations ou biocides

Dans cette sous-partie nous nous attachons à introduire les agents de conservation et les différentes classification qui permettent de les différencier entre eux. Nous décrivons également les méthodes utilisées usuellement pour déterminer leur efficacité. Nous terminons en présentant les limitations actuelles d'utilisation et de sélection de ces agents, et expliquons en quoi l'outil développé dans cette thèse peut apporter un moyen de dépasser certaines de ces limites.

4.4.1.1 Définition et enjeux

Les agents chimiques qui tuent ou inhibent la croissance des microorganismes sont connus sous plusieurs dénominations. Selon le domaine d'utilisation, on les appellera plutôt agents anti-microbiens, conservateurs, antibiotiques ou biocides. Ces termes rassemblent donc toutes les molécules ayant un effet néfaste sur le développement de microorganismes. Ils peuvent également être répartis dans des classes selon leur action sur les cellules et selon le type de microorganismes sur lesquels ils montrent un effet[7]. Les modes d'action de ces molécules sont très variés (endommagement de membrane, inhibition d'activité cellulaire, etc...) et

leur description fait appel à des concepts de microbiologie cellulaire hors du contexte de ce travail de thèse, et que nous ne décrirons donc pas ici.

Les biocides qui empêchent le développement d'une population de bactérie sans la tuer sont dits bactériostatiques. Ceux qui entraînent la mort mais sans lyser (= éclatement des cellules) font partie des bactéricides. Et enfin les agents qui causent la lyse des bactéries sont appelés bactériolytiques. Le suffixe de ces termes varient selon le type de microorganismes sur lesquels ils montrent un effet: "bactéri-" pour un effet sur les bactéries, "fongi-" pour les moisissures, et "viru-" pour les virus. La capacité d'une molécule à n'agir que sur un seul type de cellule présente un fort intérêt dans le cas de traitement in-vivo où l'on souhaite, par exemple, se débarrasser d'un contaminant sans endommager les cellules hôtes.

L'utilisation de ces composés capables de contrôler le développement microbien est utile voire indispensable dans de nombreux domaines. Dans le milieu médical par exemple, ils permettent l'élimination de microorganismes pathogènes par traitement dit "interne" de l'organisme contaminé (antibiotiques, chimiothérapie, ...) tout comme la stérilisation externe (désinfection de plaies, de matériel d'opération chirurgical,...). En industrie, les biocides permettent d'empêcher le développement de pathogènes dans des produits destinés à la consommation (agroalimentaire), ou bien la détérioration (visuelle, olfactive, efficacité, ...) de produits à conservation moyenne ou longue.

Ces applications pouvant être assez éloignées les unes des autres, elles imposent des critères de choix de biocides variés. Dans le cadre de la preuve d'efficacité du système automatisé précédemment décrit, nous nous sommes intéressés à deux biocides couramment utilisés pour la conservation de produits industriels, non destinés à la consommation. Nous décrivons dans le paragraphe suivant comment l'efficacité de ce type de produit est habituellement testée.

4.4.1.2 Le test d'efficacité biocide

L'efficacité d'un biocide se détermine principalement via deux valeurs de référence[121]: La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), et la CML (Concentration Minimale Léthale). La CMI se détermine comme la plus petite concentration qui inhibe le développement des microorganismes. Elle est généralement

mesurée à 18 ou 24h. La CML est la plus faible concentration qui va entraîner la mort d'une certaine fraction de la population initiale. Par exemple, en toxicologie/écotoxicologie, la CML qui cause 50% de décès est appelée CL50 (Concentration Léthale 50), alors que l'AFNOR définit la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) comme la concentration la plus faible qui cause la réduction d'un facteur 10^5 de la population initiale de 10^8 UFC/mL en 5 minutes à 20°C. Ces valeurs de référence permettent la classification et la comparaison des biocides entre eux.

La méthode la plus répandue pour déterminer ces valeurs consiste à préparer une gamme d'échantillons contenant chacun une concentration donnée en biocide. Les échantillons sont ensuite inoculés et mis à incuber pendant le temps choisi. Pour chaque échantillon, un comptage par dilutions successives et étalement sur boîtes de Pétri est ensuite réalisé afin de déterminer la population et de pouvoir la comparer avec l'inoculum. Cette méthode, bien que robuste, nécessite un temps de manipulation élevé et ne permet pas de tester une gamme de concentrations différentes très importante, limitant ainsi la précision du résultat.

Il faut également noter que des mesures effectuées à partir de cette même méthode peuvent aboutir des résultats significativement différents selon le protocole. *Gillat*[122] liste par exemple les paramètres suivants: choix des microorganismes, niveau d'inoculation, nombre d'inoculations, préparation de l'échantillon et méthode de dénombrement. Les temps après inoculation auxquels sont faits les dénombrements ont aussi un impact sur le résultat final. Ainsi, la comparaison de CMI/CML déterminées par des personnes/organismes différents sont difficilement comparables.

Afin de nous assurer une comparaison pertinente entre les différents résultats, nous avons sélectionné deux protocoles de test pour de nos essais. Le premier correspond à un protocole dit "de référence" et illustre les résultats obtenus par une méthode classique. Le second est dérivé du premier de façon à inclure l'utilisation du système de mesure automatisé. Nous considérons que la CMI est atteinte quand la population au temps de mesure est inférieure ou égale à la population initiale. Nous reviendrons sur les valeurs définies précédemment à la fin de ce chapitre, après avoir présenté les résultats expérimentaux. Le tableau 4.2 référence les paramètres utilisés dans ces deux protocoles.

Paramètre	Protocole	
	Référence	Automatisé
Microorganisme	<i>Ecoli</i> MC4100-YFP	<i>Ecoli</i> MC4100-YFP
Inoculation	1.10^{5-6} UFC/mL	1.10^{5-6} UFC/mL
Préparation échantillon	Mélange par vortex	Mélange par vortex
Mode de culture	Erlenmeyer	Goutte
Méthode de comptage	Dilutions et boîtes de Pétri	Fluorescence/Absorbance
Comptages	entre 1 et 4 jours	en continu
Critère de validation	Population \leq Inoculation	Population \leq Inoculation

TABLEAU 4.2: Protocoles de détermination de CMI

4.4.1.3 Les limites des méthodes classiques

Pour les applications industrielles des biocides, les agents couramment utilisés pour la protection de produits et/ou décontamination ont souvent dans leur composition au moins l'un des composés suivants: dérivés du mercure, du chlore, phénol ou métaux lourds, ou encore détergents cationiques et molécules de la famille des "isothiazolinones". Bien qu'efficaces et bien connus, ces composés peuvent poser des problèmes de toxicité. L'évolution des réglementations tend à limiter voire interdire leur utilisation et la recherche de nouveaux produits moins toxiques, ou bien de synergies entre composés suscite donc un très fort intérêt.

Comme évoqué précédemment, les méthodes classiques de détermination d'efficacité de biocide qui permettent cette exploration de nouvelles formulations ont bien souvent une précision limitée et/ou requiert un temps de manipulation rapidement élevé. Bien qu'efficaces et robustes, ces techniques ne sont donc pas adaptées au criblage. Cependant, l'exploration de molécules candidates ou de formulations requiert le passage par cette étape. A titre d'illustration, nous présentons dans le tableau 4.3 le temps de manipulation (T_{manip}) nécessaire pour réaliser les tests d'efficacité de 1 à 100 molécules, pour 2 à 20 concentrations, en fixant le nombre de comptages à deux par échantillon. Les temps présentés sont en heures et arrondis à l'heure supérieure. Le temps de préparation d'un échantillon (1 molécule, 1 concentration) est estimé à 5 minutes, le temps nécessaire pour réaliser deux comptages par dilutions et étalement sur boîtes de Pétri est lui estimé à 15 minutes:

$$T_{manip} = (Nb\ mol \cdot Nb\ conc) \cdot (5 + 15) \quad (4.1)$$

Temps de manipulation en heures par la méthode de référence										
Nombre de molécules testées	Nombre de concentrations testées									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1	1	1	2	3	3	4	5	5	6	7
2	1	3	4	5	7	8	9	11	12	13
5	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33
10	7	13	20	27	33	40	47	53	60	67
20	13	27	40	53	67	80	93	107	120	133
100	67	133	200	367	333	400	467	533	600	667

TABLEAU 4.3: Temps (en heures) de manipulation nécessaire à la détermination de CMI avec deux comptages dans le temps par la méthode de référence. Ces durées n'incluent pas les temps d'incubation mais uniquement les temps que le manipulateur passe à préparer les échantillons et les dénombrer. Les temps présentés sont en heures et arrondis à l'heure supérieure.

On peut voir dans le tableau que pour de faibles quantités de molécules à tester et/ou de concentrations à évaluer, le nombre d'heures passées à la pailasse par le manipulateur reste raisonnable. Pour des études où le besoin en tests est modéré, la méthode de référence s'avère donc très efficace. En revanche, si l'on souhaite s'approcher d'un criblage (grand nombre de molécules) en ayant une bonne précision de mesure (grand nombre de concentrations), on s'aperçoit que le temps d'occupation du manipulateur dépasse rapidement l'équivalent d'une journée de travail, voire même d'une semaine de travail à 35 heures (chiffres en rouge dans le tableau). A ces limitations de temps, il est important d'ajouter également les limites de place: 1 erlenmeyer occupe environ 0.036 m², 100 erlenmeyers (10 molécules à 10 concentrations) occupent donc 3.6 m² et 2000 erlenmeyers (100 molécules à 20 concentrations) occupent 7.2 m²! Ces surfaces devant procurer une agitation et être dans un espace thermostaté, cela est impossible à gérer au niveau d'un laboratoire.

Le besoin de réaliser autant de tests étant pourtant bien réel, il est nécessaire de les optimiser. C'est pour répondre à ce besoin, nous avons développé un outil couplant des incubateurs miniaturisés avec une méthode de mesure de population en ligne qui permet de suivre la croissance simultanée d'un grand nombre de cultures. En utilisant ce dispositif, les temps d'occupation du manipulateur sont modifiés comme le présente le tableau 4.4. Les temps de manipulation sont calculés en décomposant la phase de préparation de la solution mère pour chaque molécule, le remplissage de chaque tube, et l'analyse des données. Le temps de préparation

Temps de manipulation en heures par la méthode automatisée										
Nombre de molécules testées	Nombre de concentrations testées									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
5	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3
10	1	2	3	3	3	4	4	5	5	6
20	3	4	4	5	6	7	8	9	10	10
100	12	16	21	25	29	33	37	41	45	49

TABLEAU 4.4: Temps (en heures) de manipulation nécessaire à la détermination de CMI par la méthode automatisée. Ces durées n'incluent pas les temps d'incubation mais uniquement les temps que le manipulateur passe à préparer les échantillons et les dénombrer. Les temps présentés sont en heures et arrondis à l'heure supérieure.

de la solution mère est identique à celui de la préparation des erlenmeyers pour les tests classiques, soit 5 minutes. A partir de cette solution, le remplissage d'un tube avec une série de gouttes d'incubation est estimé à 2 minutes. Enfin, les résultats obtenus par le suivi de 25 tubes maximum en simultané sont analysés d'un seul bloc en 30 minutes environ. Les temps présentés sont en heures et arrondis à l'heure supérieure. Le calcul du temps de préparation est alors effectué de la façon suivante:

$$T_{manip} = (Nb\ mol . 5) + (Nb\ conc . 2) + \left(\frac{Nb\ mol . Nb\ conc}{25} . 30 \right) \quad (4.2)$$

On voit dans ce dernier tableau que la forte parallélisation et le fonctionnement autonome du système permettent de réduire significativement les temps d'occupation du manipulateur, donnant accès à des études de criblages. De plus, les données acquises par le système automatisé fournissent bien plus de renseignements que des comptages ponctuels. Toutefois, il est raisonnable de s'interroger sur la fidélité de résultats obtenus dans des gouttes millimétriques par rapport à ceux que l'on obtiendrait en erlenmeyers décimétriques. Nous avons vu en effet dans les chapitre précédents que les conditions d'incubation peuvent différer d'un type d'incubateur à l'autre, et cela pourrait entraîner des écarts de CMI mesurées. Nous détaillons le gain d'information fourni par le système automatisé et discutons la comparabilité des résultats miniaturisés et classiques en nous appuyant sur

l'exemple de deux tests biocides dans la sous-section suivante.

4.4.2 Détermination expérimentale de CMI

Nous avons évalué l'efficacité du système automatisé développé dans ce travail de thèse pour la détermination de la CMI de deux biocides connus, et par comparaison des résultats à ceux obtenus par la méthode de référence. Nous présentons ici dans un premier temps le test de l'Acticide MBS, en évoquant les informations supplémentaires accessibles grâce au système automatisé. Puis, nous exposons les résultats obtenus pour les tests d'efficacité du Glokill PQ et comparons les données statistiques du système automatisé à celles de l'Acticide MBS.

4.4.2.1 Acticide MBS

L'Acticide MBS est un produit aux propriétés biocides commercialisé par THOR. Il s'agit d'une formulation en base aqueuse de deux principes actifs: le 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one (ou Methyisothiazolinone ou MIT, CAS : 2682-20-4), et le 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one (ou Benzisothiazolinone ou BIT, CAS:2634-33-5). La formulation commerciale utilisée pour ces essais contient 5% de mélange MIT+BIT. La Figure 4.6 représente ces molécules.

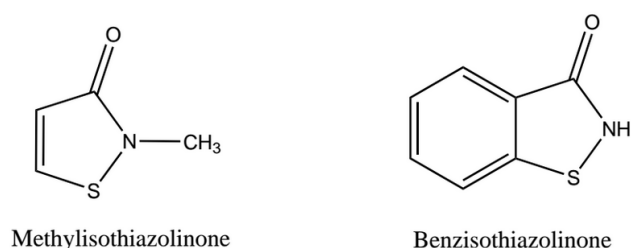


FIGURE 4.6: Formules développées des molécules actives de l'Acticide MBS

Cette formulation présente l'avantage d'être stable sur de larges gammes de températures et pH, et de posséder une activité anti-microbienne de large spectre. Le fabricant, THOR, donne des valeurs de concentrations minimales inhibitrices inférieures à 20 ppm pour les bactéries et les champignons. Dans le cas plus particulier de la bactérie *E.coli*, cette valeur annoncée est de 10ppm de produit actif (MIT + BIT) qui sont présents à 5% dans la formulation de base utilisée ici. Afin

N°	Concentration LB (g/L)	Population initiale (UFC/mL)	Concentration Acticide MBS (mg/L)
1	5	10^6	199.8
2	5	10^6	296.8
3	5	10^6	391.9
4	5	10^6	485.2
5	5	10^6	576.8
6	5	10^6	666.6

TABLEAU 4.5: Composition des erlenmeyers pour le test d'Acticide MBS

de valider notre dispositif automatisé vis-à-vis de ces données fabricants, nous réalisons des tests d'efficacité classiques en erlenmeyer, et automatisé en gouttes. Le tableau 4.5 présente les compositions des milieux testés par la méthode de référence en erlenmeyer.

Pour chacune des formulations décrites dans le tableau, une culture a été menée durant 72 heures à 30°C. Un comptage par dilutions successives et étalements sur boîte de Pétri a été effectué au moment de l'inoculation puis à 48 et 72 heures. La Figure 4.7 montre le résultat de ces comptages. En début de culture, on peut voir que l'inoculum est identique dans tous les échantillons. Après 48h, la population est inférieure ou égale à la valeur de l'inoculum pour toutes les compositions testées, excepté pour la plus faible. L'échantillon 1 correspond à une composition en Acticide MBS inférieure à la CMI. Pour les autres compositions, en revanche, la population a diminué, la CMI est atteinte. Si l'on observe à présent les résultats des comptages à 72h, on peut voir que les populations sont plus importantes qu'à 48h, pour tous les échantillons. Toutefois, on note que les échantillons 1 et 2 sont les seuls qui contiennent des populations en *Ecoli* supérieures à l'inoculum. On détermine donc la CMI de l'Acticide MBS comme comprise entre les concentrations des échantillons 2 et 3, soit entre 199.8 et 296.8 mg/L à 48h et entre 296.8 et 391.9 mg/L à 72h. Par souci de comparaison avec les mesures en gouttes, la valeur à 48h sera retenue ici. Les populations des échantillons contenant une concentration en Acticide MBS supérieure à la CMI étant proches de la valeur d'inoculation (moins de 2 log de réduction), on attribue à l'Acticide MBS un effet bactériostatique et non bactéricide.

Le suivi d'évolution de populations a ensuite été réalisé en utilisant le système

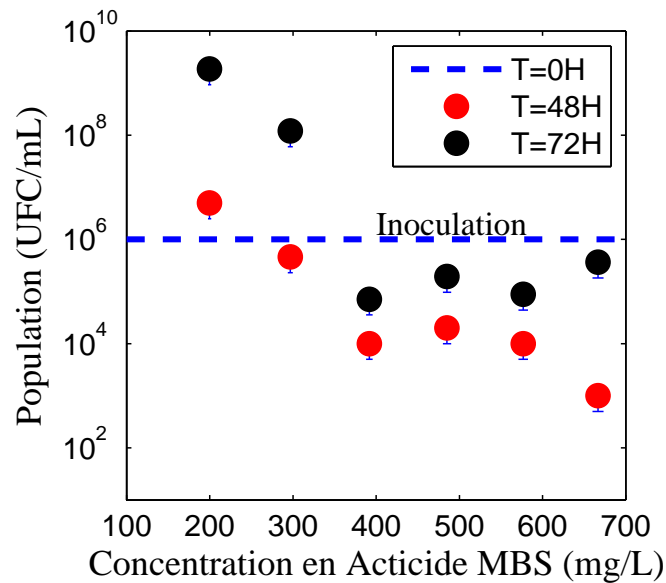


FIGURE 4.7: Résultats du test d'efficacité de l'Acticide MBS par la méthode de référence

automatisé. Un plus grand nombre d'échantillons ont pu être testés que par la méthode de référence. Le tableau 4.6 donne les compositions de chaque échantillon. Pour rappel, nous précisons que chaque échantillon bénéficie de plusieurs répliquas dans ce dispositif: chaque tube contient une série de gouttes de même composition.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 4.8. La première observation permet de prendre conscience du gain d'information par rapport aux résultats obtenus par la méthode classique. Les courbes de croissance complètes sont en effet ici obtenues, au lieu de quelques points, et une dizaine de répliquas sont disponibles pour chaque composition. Sur la Figure, l'échelle de l'axe Z est en unité arbitraire de Fluorescence/Absorbance et doit être proportionnelle à la population. La population en phase stationnaire de notre souche dans le milieu LB à 5g/L est connue à environ 10^9 UFC/mL, et la concentration d'inoculation est de 10^6 UFC/mL. L'échantillon ne contenant pas de biocide (bleu tout à gauche) correspond à la référence de croissance et montre bien une augmentation d'environ 10^3 unités arbitraires, ce qui valide la proportionnalité et indique que le niveau zéro de l'axe Z correspond bien au niveau d'inoculation. Cela nous permet d'affirmer que pour des concentrations supérieures ou égales à 278mg/L, la population à 48h est inférieure ou égale à l'inoculum, et donc que la CMI est atteinte (critère défini dans le tableau 4.2).

N°	Concentration LB (g/L)	Population initiale (UFC/mL)	Concentration Acticide MBS (mg/L)
1	5	10^6	0
2	5	10^6	70
3	5	10^6	139
4	5	10^6	174
5	5	10^6	191
6	5	10^6	209
7	5	10^6	222
8	5	10^6	236
9	5	10^6	250
10	5	10^6	264
11	5	10^6	278
12	5	10^6	292
13	5	10^6	320
14	5	10^6	334
15	5	10^6	348
16	5	10^6	365
17	5	10^6	382
18	5	10^6	417

TABLEAU 4.6: Composition des gouttes pour le test automatisé d'Acticide MBS

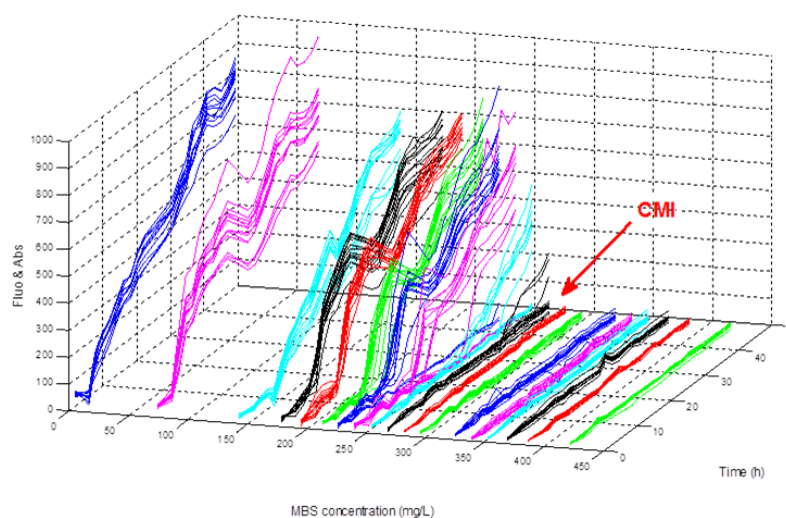


FIGURE 4.8: Résultats du test d'efficacité de l'Acticide MBS par la méthode de référence

Méthode	Référence	Automatisée
Formulation	296,8 < CMI (mg/L) < 391,9	264 < CMI (mg/L) < 278
Actif	14.8 < CMI (mg/L) < 19.6	13.2 < CMI (mg/L) < 13.9

TABLEAU 4.7: Valeurs de CMI de l'Acticide MBS déterminées par les méthodes de référence et automatisée.

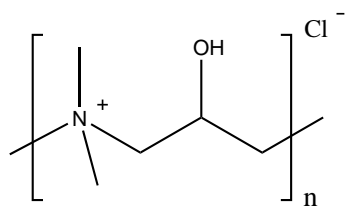
Par comparaison au résultat obtenu par la méthode de référence, la valeur de CMI déterminée en goutte est légèrement plus faible. Le tableau 4.7 résume ces valeurs et donne également les valeurs de CMI en actifs purs (MIT + BIT), sachant que la formulation utilisée en contient 5%. Cependant, la mesure en goutte a été réalisée jusqu'à 48h au lieu de 72h par la méthode de référence. Si l'on compare la CMI obtenue en gouttes avec la CMI que l'on aurait déterminée après 48h de culture en erlenmeyer, on s'aperçoit que les valeurs se situent dans la même gamme. En effet, la Figure 4.7 montre que seule la population de l'erlenmeyer avec une concentration de 199.8mg/L d'Acticide MBS a légèrement augmenté par rapport à l'inoculum. Dans le cas de l'Acticide MBS, la CMI déterminée par les deux méthodes correspond donc, dans les limites de précision des mesures en erlenmeyer.

De façon à obtenir une seconde validation de l'outil développé pour la détermination de CMI, nous avons réalisé le même type d'étude avec un second biocide: le Glokill PQ.

4.4.2.2 Glokill PQ

Le Glokill PQ est un biocide commercialisé par la société SOLVAY-Novecare. Le composé actif est le poly(2-hydroxypropyldiméthylammonium chlorure) (CAS : 25988-97-0), à 50% en solution aqueuse dans la formulation utilisée pour cette étude. La Figure 4.9 représente cette molécule. Cette formulation est principalement utilisée dans les traitements antifongiques pour le traitement des eaux industrielles ou des eaux de piscines.

Nous avons réalisé pour le Glokill PQ des tests similaires à ceux réalisés pour l'Acticide MBS. Tous les échantillons ont une composition identique en milieu de culture LB (5 g/L) et le même inoculum de départ (10^6 UFC/mL). Le tableau 4.8 montre la concentration en Glokill PQ des échantillons testés pour chaque type



poly(2-hydroxypropyldimethylammonium chlorure)

FIGURE 4.9: Formule développée de l'actif du Glokill PQ.

N°	Concentration en Glokill PQ (mg/L)	
	Référence	Automatisé
1	0	0.0
2	0.6	0.1
3	5.5	0.3
4	22.0	0.7
5	55.0	0.9
6	110.0	1.1
7	X	1.7
8	X	2.2
9	X	3.3
10	X	5.5
11	X	7.7
12	X	9.9
13	X	16.5
14	X	33.0
15	X	44.0
16	X	55.0
17	X	66.0
18	X	77.0
19	X	88.0

TABLEAU 4.8: Composition des échantillons pour le test d'efficacité du Glokill PQ

d'incubateur.

Les résultats obtenus par la méthode de référence sont présentés sur la Figure 4.10 pour un comptage effectué à 39h après l'inoculation. Contrairement au cas de l'Acticide MBS, on voit ici une réduction drastique de la population au delà de la valeur de CMI (entre 3 et 6 log de réduction) qui peut être placée entre les échantillons 2 et 3, soit entre 0.6 et 5.5 mg/L. La formulation utilisée comme

base contenant 50% d'actif, cela donne une CMI entre 0.3 et 2.8 mg/L de poly(2-hydroxypropyldiméthylammonium chlorure). L'effet du Glokill PQ est qualifié de bactéricide dès que sa CMI est franchie.

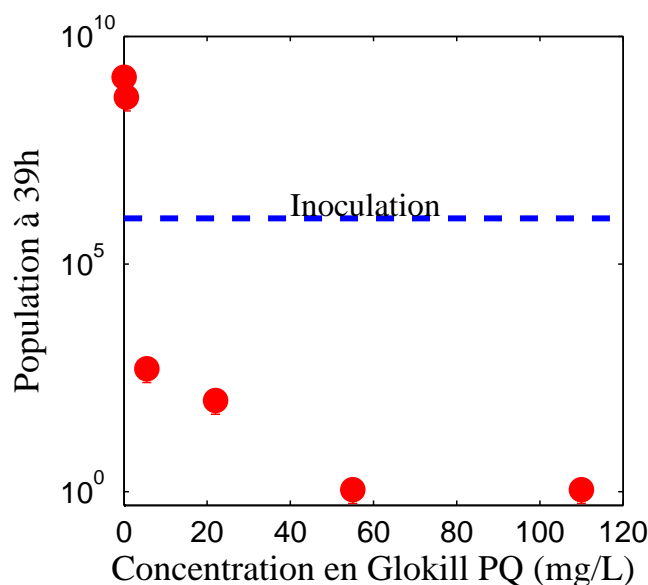


FIGURE 4.10: Résultats du test d'efficacité du Glokill PQ à 39h par la méthode de référence.

Pour la détermination de CMI par la méthode automatisée, les compositions détaillées dans le tableau 4.8 ont été testées. Les courbes de croissance sont présentées sur la Figure 4.11. Le graphique supérieur correspond aux résultats obtenus sur l'ensemble des compositions, celui du bas montre un grossissement sur les concentrations en Glokill PQ proches de la CMI. On remarque que tous les échantillons contenant plus de 3.3 mg/L de biocide ne montre aucune croissance (le temps maximal affiché est de 40h par souci de clarté des graphiques, mais le résultat est confirmé jusqu'à 72h). D'après ces données, la CMI se situe donc entre les compositions des échantillons 8 et 9, soit entre 2.2 et 3.3 mg/L.

Le tableau 4.9 donne les valeurs de CMI déterminées par les deux méthodes. On remarque ici aussi un bon accord entre ces valeurs. On peut également noter la précision de la détermination de CMI. En effet, dans le cas du Glokill PQ, tout comme dans celui de l'Acticide MBS (tableau 4.9), on obtient une valeur de CMI 4 à 7 fois plus précise avec la méthode automatisée qu'avec la méthode classique.

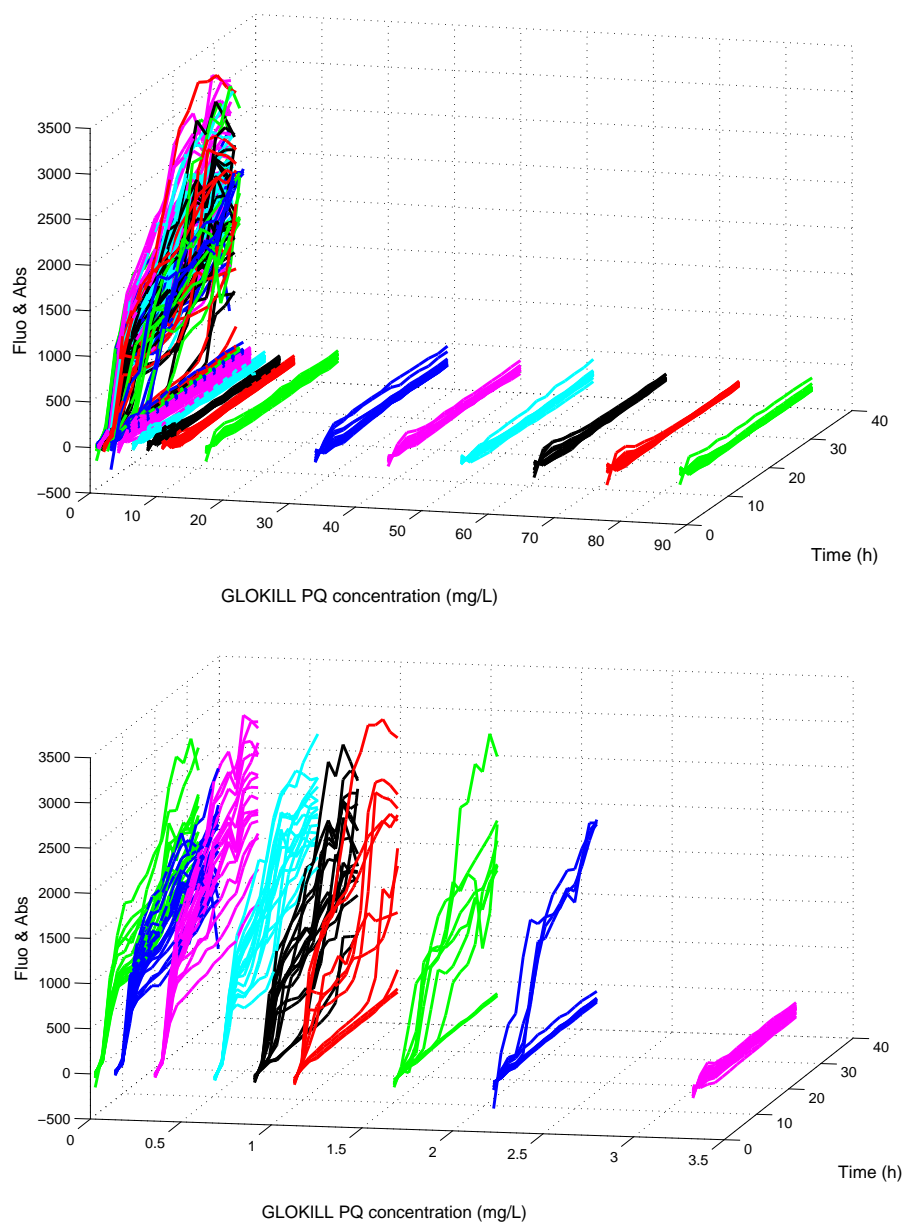


FIGURE 4.11: Résultats du test d'efficacité du Glokill PQ par la méthode de automatisée.

Bien que de précisions différentes, les valeurs de CMI obtenues par les deux méthodes correspondent. Cela signifie que dans les conditions utilisées, la réduction de la taille de l'incubateur n'impacte pas l'efficacité des biocides. Ce résultat est particulièrement satisfaisant dans l'idée de remplacer ou compléter la méthode de référence par la méthode automatisée car leur résultats sont équivalents. Cependant, nous avons vu dans le chapitre précédent que le changement de conditions d'incubation pouvait impacter le développement des microorganismes, et il paraît

Méthode	Référence	Automatisée
Formulation	$0.6 < \text{CMI (mg/L)} < 5.5$	$2.2 < \text{CMI (mg/L)} < 3.3$
Actif	$0.3 < \text{CMI (mg/L)} < 2.8$	$1.1 < \text{CMI (mg/L)} < 1.7$

TABLEAU 4.9: Valeurs de CMI du Glokill PQ déterminées par les méthodes de référence et automatisée.

donc intéressant de comparer des valeurs de CMI déterminées dans des conditions différentes de celles utilisées ici (anaérobies par exemple). Ces travaux sont en cours à la date de rédaction de ce manuscrit, mais malheureusement trop précoces pour pouvoir présenter ici des conclusions.

4.4.3 L'accès à des données statistiques

L'utilisation du système automatisé pour le suivi de croissance d'échantillons contenant des concentrations croissantes en biocide permet de révéler des comportements qui donnent des informations supplémentaires à la valeur de CMI. La Figure 4.12 montre les courbes de croissances de chaque goutte d'un même tube contenant une concentration légèrement inférieure à la CMI en Acticide MBS (à gauche) ou en Glokill PQ (à droite). On rappelle que les écarts apparemment importants de population au plateau visibles sur ces courbes sont dus au type de représentation, comme expliqué dans le paragraphe 4.3.1.

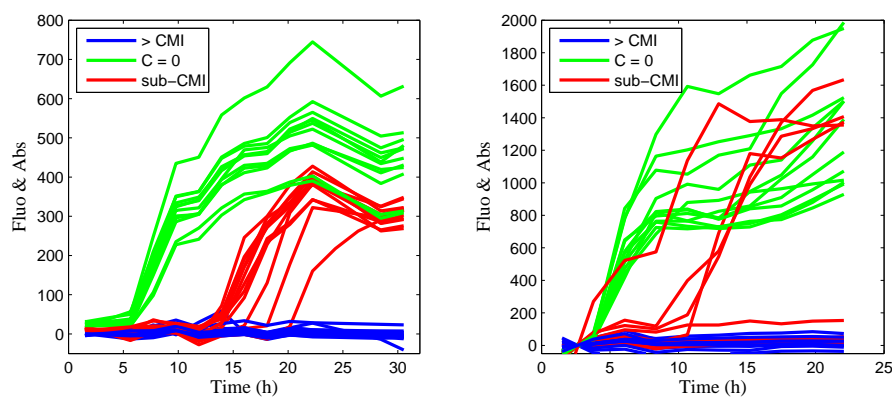


FIGURE 4.12: Courbes de croissance de *E. coli* dans le LB à 5 g/L en présence d'Acticide MBS (à gauche), et de Glokill PQ (à droite). Les concentrations en biocide présentées correspondent dans les deux cas à une zone de non effet (vert), d'inhibition (bleu) et à une zone intermédiaire sub-CMI (rouge).

On se rend compte grâce à ces courbes, que des incubateurs de compositions identiques peuvent montrer des comportements différents lorsque la concentration en biocide est proche mais inférieure à la CMI (courbes rouges). De façon à explorer ces comportements plus en détail, nous avons identifié deux paramètres qui ont pour but d'en rendre compte: le temps de latence de chaque incubateur et la fréquence de croissance pour une composition donnée (c'est-à-dire le nombre de gouttes où il y a croissance sur le nombre de gouttes total pour une composition donnée). Les Figures 4.13 et 4.14 exposent les valeurs obtenues respectivement pour l'Acticide MBS et le Glokill PQ.

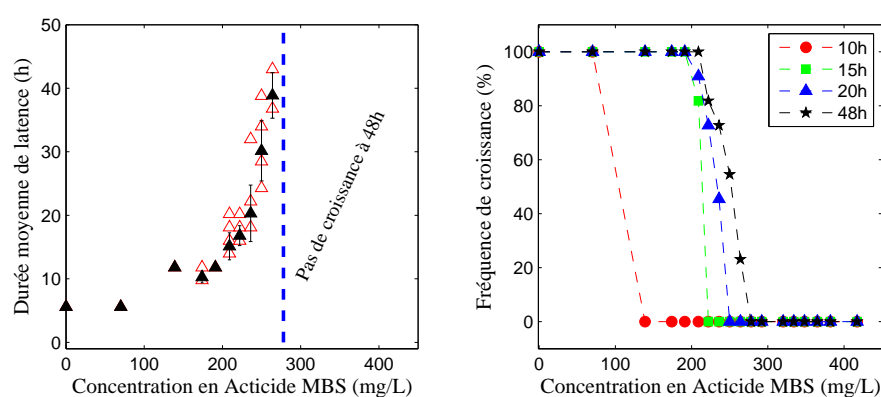


FIGURE 4.13: Fréquence de croissance à 48h sur les répétitions de culture sur système automatisé avec Acticide MBS (à gauche), et temps de latence à 10h, 15h, 20h, et 48h (à droite).

Les courbes de gauche représente le temps de latence mesuré pour chaque incubateur (triangles rouges), ainsi que la moyenne des temps de latence de tous les incubateurs d'un même tube (= 1 composition) où il y a eu croissance. Les courbes de droite correspondent à la fréquence de croissance mesurée à différents temps. C'est à dire le nombre de gouttes dans lesquelles il y a eu croissance au temps de mesure, sur le nombre de gouttes total de même composition.

Si l'on se focalise tout d'abord sur les graphes représentant le temps de latence en fonction de la concentration en biocide, on remarque que pour des concentration inférieures aux CMI, le biocide montre déjà un effet marqué. Cette zone d'effet est appelée sub-CMI. Les effets observés pour les deux biocide testés sont cependant assez différents. On remarque en effet une hausse commune du temps de latence moyen, mais alors qu'elle augmente selon un profil de type exponentiel dans le cas de l'Acticide MBS, elle est simplement multipliée par un facteur 2

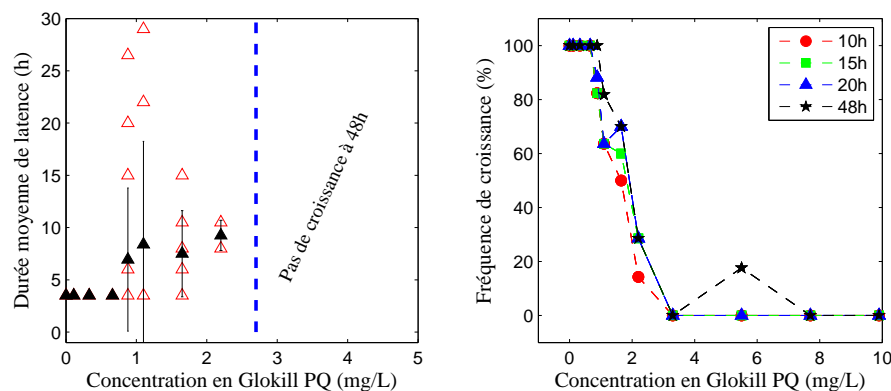


FIGURE 4.14: Fréquence de croissance à 48h sur les répétitions de culture sur système automatisé avec Glokill PQ (à gauche), et temps de latence à 10h, 15h, 20h, et 48h (à droite).

dans le cas du Glokill PQ. A l'inverse, la dispersion des temps de latence entre incubateurs de même composition qui augmente progressivement dans le cas de l'Acticide MBS atteint sa valeur maximale dès l'entrée dans la zone sub-CMI et tend à décroître en se rapprochant plus de la CMI.

Les graphes représentant la fréquence de croissance en fonction de la concentration montre quant à eux des profils similaires. D'une croissance dans tous les incubateurs quand la concentration en biocide est inférieure à la sub-CMI, la fréquence de croissance décroît jusqu'à ce que plus aucun incubateur n'affiche de croissance au-delà de la CMI. Il existe cependant une différence importante entre les graphes de l'Acticide MBS et du Glokill PQ. Dans le cas de l'Acticide MBS, on remarque que plus le temps de mesure est tardif, plus l'étalement est visible, et plus la CMI est repoussée. On voit sur le graphe du Glokill PQ qu'au contraire, les fréquences de croissance sont indépendantes du temps auquel la mesure est faite (dans la plage de temps utilisée).

Au vue des résultats obtenus par la méthode classique, nous savons que l'Acticide MBS a un effet bactériostatique au-delà de sa CMI, alors que le Glokill PQ est bactéricide. Les modes d'action référencés des dérivés d'isothiazolone (Acticide MBS) et des ammonium quaternaires (Glokill PQ) sont en accord avec ces observations[123]. Par ailleurs, l'action d'un biocide sur un microorganisme se décompose en une phase d'adsorption de la molécule sur la membrane du microorganisme, une phase de pénétration à travers la membrane, et enfin une phase

d'action de la molécule biocide sur une cible cellulaire qui lui est propre (membranes, cytoplasme, etc...)[121]. Une croissance qui démarre malgré la présence de biocide signifie que les microorganismes sont parvenus à stopper l'une de ces étapes ou à les limiter de façon à pouvoir se développer.

On peut donc interpréter les courbes acquises dans le cas de l'Acticide MBS comme une manifestation de son effet inhibiteur de croissance. Quand sa concentration augmente et se rapproche de la CMI, l'inhibition devient de plus en plus importante et entraîne une forte augmentation du temps de latence. Pour des temps de latence plus long, l'écart relatif entre les répliquas prend de l'importance et explique l'échelonnement des fréquences de croissance en fonction de la concentration et du temps d'analyse.

Dans le cas du Glokill, on peut supposer qu'à une concentration donnée s'associe une probabilité de survie des microorganismes. Cette probabilité étant de 100% quand on est en dessous de la CMI et de 0% au delà la CML. Le temps de latence est donc faiblement impacté par ce phénomène qui amène à discriminer rapidement s'il reste des bactéries en vie dans la gouttes pour se développer ou non. Pour expliquer l'échelonnement des fréquences de croissance en fonction de la concentration en Glokill PQ, il faut considérer le nombre de microorganismes par gouttes. En effet, une goutte de 5 μL inoculée à 10^6 UFC/mL contient 5000 bactéries. Ainsi, si la probabilité de survie à l'interaction du biocide descend sous les 0.02%, le nombre moyen de bactéries par goutte qui restent en vie devient inférieur à 1 ($0.02\% \times 5000 = 1$). Ainsi, on peut obtenir des survivants dans certaines gouttes alors que d'autres gouttes de même composition n'en auront aucun.

De façon synthétique, la mesure du temps de latence et de la fréquence de croissance rendus possibles par l'utilisation du système automatisé semblent permettre d'identifier des comportements propres à l'action du biocide sur les bactéries. Cette discussion mérite bien évidemment une analyse plus poussée via le test d'autres biocides par exemple. Les idées présentées sont pour le moment des suggestions, et des travaux en cours à la date de cette rédaction ont pour but de les confirmer/infirmes. Il apparaît toutefois clairement que l'utilisation du système automatisé pour les tests d'efficacité biocide présente d'autres avantages que l'optimisation de détermination de CMI.

POINTS CLÉS DU CHAPITRE:

- Le contrôle par ordinateur d'une série d'équipements permet l'acquisition régulière et autonome d'une mesure de population dans des milli-incubateurs parallélisés.
- L'utilisation de ce dispositif permet le suivi cinétique simultané de croissance d'un dizaine de répliquas de 25 échantillons différents.
- L'application de ce système à la détermination de concentration minimale inhibitrice de biocides donne des résultats d'une meilleure précision que les tests classiques, et fourni des données statistiques qui renseignent sur l'interaction biocide-microorganisme.

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous nous étions fixé comme objectif principal de mettre au point un dispositif de suivi de croissance haut-débit permettant de réaliser des tests d'efficacité biocide. Pour cela, le développement de dispositifs de culture miniaturisés et de méthodes d'analyses en ligne adaptées était nécessaire. Le passage d'incubateurs classiques de l'ordre de la centaine de millilitres à des incubateurs miniaturisés de volumes inférieurs à la dizaine de microlitres nous a également motivé à mener une étude approfondie de l'impact de la réduction d'échelle sur le développement des microorganismes.

Les outils microfluidiques permettent d'atteindre un degré de parallélisation supérieur aux outils millifluidiques. Cependant, ils requièrent le passage par des étapes de microfabrication complexes et sensibles, contrairement aux dispositifs millifluidiques simples et flexibles d'utilisation. La recherche de techniques compatibles pour des analyses routinières et peu coûteuses nous a donc poussé à choisir les montages millifluidiques pour la poursuite du développement de l'outil haut-débit.

Avec la mise au point de ces incubateurs miniaturisés, la question de l'impact de la réduction de taille des incubateurs sur le développement des microorganismes s'est posée. Nous avons donc réalisé une série d'expérimentations dans des incubateurs de différentes tailles et configurations. Le contrôle des géométries et des conditions expérimentales nous a permis de suivre l'évolution de populations moyennes dans plusieurs profils de concentrations en gaz et nutriments parfaitement connus. Les résultats nous ont conduit à identifier l'apport en oxygène par diffusion comme le phénomène limitant dans la phase exponentielle de croissance. La culture dans des incubateurs dont la taille est suffisamment faible pour que le transport de l'oxygène par diffusion soit efficace permet donc d'améliorer la cinétique de croissance des microorganismes. La population en phase stationnaire est elle optimale quand les réserves en oxygène et en nutriments sont excédantes. Quand l'une de ces réserves est trop faible, la population au plateau peut être réduite d'un facteur

dix par rapport à l'optimum. La croissance a été ensuite modélisée en intégrant les conditions locales et les vitesses de croissance et populations en phase stationnaire optimales et minimales extraites des données d'expériences. Une loi de croissance fonction de l'oxygène et des équations de diffusion / consommation nous ont permis de retrouver les résultats expérimentaux par le biais de paramètres ajustables. Ces paramètres traduisent le métabolisme des bactéries et ont donné accès à leur dépendance vis-à-vis de l'oxygène et des nutriments.

Les incubateurs miniaturisés ayant montré leur efficacité pour la croissance de microorganismes, nous avons ensuite cherché à mettre au point une méthode permettant d'optimiser le suivi de croissance. Les comptages par dilutions et étalements étant en effet trop peu efficaces pour atteindre le haut-débit. Nous avons donc exploré des méthodes analytiques à la recherche de techniques en ligne, non-intrusives, quantitatives et rapides. Certaines techniques d'intérêt ont été identifiées, mais seuls la mesure couplée de fluorescence et d'absorbance et le comptage microscopique direct ont satisfait à tous les critères. La quantité de données à gérer dans le cas du comptage optique a toutefois bridé son applicabilité pour le haut-débit et les mesures de fluorescence/absorbance ont été choisies pour le couplage avec les incubateurs miniaturisés.

Enfin, nous nous sommes attachés à automatiser la mesure de fluorescence/absorbance sur les gouttes millifluidiques. La parallélisation rendue possible par la miniaturisation et les mesures rapides ne permettent en effet pas de réaliser des suivis haut-débit si le passage de l'échantillon devant le détecteur d'analyse doit se faire de façon manuelle. Un montage support a donc été conçu afin de pouvoir accueillir jusqu'à 25 tubes millifluidiques contenant chacun une quinzaine de gouttes identiques. La rotation du support permet l'agitation des gouttes ainsi que le passage de chaque incubateur devant le détecteur à intervalle de temps régulier. La coordination des différents équipements et le traitement de données simultanées donne accès au suivi cinétique de population dans chacun des incubateurs présents sur le support. Cet outil a été validé pour la détermination de concentration minimale inhibitrice de biocides par comparaison à une méthode de référence. Sa capacité à fournir un nombre important de données a également montré son potentiel pour accéder à des informations statistiques de croissances en présence d'agents anti-bactériens. L'analyse de ces résultats nous a permis de déduire l'action bactéricide ou bactériostatique des agents actifs sur les microorganismes.

Le dispositif de caractérisation de biocides haut-débit qui constituait l'axe directeur du travail a donc pu être développé et validé au cours de cette thèse. Les méthodes explorées pendant le développement de cet outil offrent également des perspectives très intéressantes d'extension ou d'amélioration du système actuel. Les informations concernant l'activité des biocides, accessibles par son utilisation, permettent d'envisager des études plus complètes d'évaluation des biocides et peut être une meilleure compréhension de leur activité. Par ailleurs, la méthode d'analyse de l'impact de la taille des incubateurs sur la croissance par cultures multi-échelles et modélisation numérique donne accès à des études paramétriques qui semblent présenter un potentiel intéressant pour l'exploration de métabolismes microbiens et/ou d'optimisation de bioprocédés. Des travaux sont en cours en l'heure actuelle dans ces directions.

Annexe A

Model modifications for cylindrical and spherical symmetries

The glass vial with sealed cap containing a tunable ratio, of fluorinated oil-culture medium (incubator 2) has a rectangular shape. As incubator 1, it can be considered as one dimensional. Microorganisms and nutrients remain in water. We thus apply a zero flux boundary condition at the aqueous phase boundary. We also apply a no flux boundary conditions at the sealed interface($x=0$, $x=L$) and assume that the concentration of gases in water close to the interface remains proportional to the one located in the oil close to the interface ($x=a$). In the incubator 2 situation, O_2^o , the oxygen's concentration in the oil, is defined between $x=a$ and $x=L$; O_2^w , the oxygen's concentration in water, between $x=0$ and $x=a$. We replace in Equation 3.10 the diffusion coefficient with the following:

$$D_{O_2}^{app}(x < a) = D_{O_2}^w, \quad D_{O_2}^{app}(x > a) = D_{O_2}^o, \quad (\text{A.1})$$

$$(\text{A.2})$$

And the boundary conditions are written:

$$\frac{\partial P}{\partial x}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial O_2}{\partial x}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial N}{\partial x}(t, 0) = 0, \quad (\text{A.3})$$

$$\text{for } x = 0 \quad (\text{A.4})$$

$$\frac{\partial P}{\partial x}(t, a) = 0, \quad O_2(t, a) = \beta O_2^o(t, a), \quad \frac{\partial N}{\partial x}(t, a) = 0, \quad (\text{A.5})$$

$$\text{for } x = a \quad (\text{A.6})$$

where $\beta = \frac{O_2^*}{O_2^o}$.

$$\frac{\partial O_2}{\partial x}(t, L) = 0 \quad \text{for } x = L \quad (\text{A.7})$$

The initial conditions are

$$P(0, x < a) = P_{ini}, \quad P(0, x > a) = 0, \quad (\text{A.8})$$

$$O_2(0, x < a) = O_2^*, \quad O_2(0, x > a) = O_2^{o*}, \quad (\text{A.9})$$

$$N(0, x < a) = N_{ini}, \quad N(0, x > a) = 0 \quad (\text{A.10})$$

In the incubator 3's situation, the drops are spherical. The concentration fields have a spherical symmetry and depend only upon ρ which is the distance from the center to the point under scrutiny. The Laplacian operator takes the following form:

$$\Delta = \frac{1}{\rho^2} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho^2 \frac{\partial}{\partial \rho} \right) \quad (\text{A.11})$$

Drops are surrounded by oil. Microorganisms and nutrients remain in water. We thus apply a zero flux boundary condition at the aqueous phase boundary. As the tubings are permeable and as gases are highly soluble in oil, we assume that the amount of gases remains constant in oil and set the gases' concentrations at the boundary of the drop equal to their solubilities in water. All the fluxes are equal to zero at the center of the drop due to spherical geometry.

$$\frac{\partial P}{\partial \rho}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial O_2}{\partial \rho}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial N}{\partial \rho}(t, 0) = 0, \quad (\text{A.12})$$

$$\text{for } \rho = 0 \quad (\text{A.13})$$

$$\frac{\partial P}{\partial \rho}(t, \rho) = 0, \quad O_2(t, \rho) = O_2^*, \quad \frac{\partial N}{\partial \rho}(t, \rho) = 0, \quad (\text{A.14})$$

$$\text{for } \rho = R_{drop} \quad (\text{A.15})$$

where R_{drop} is the radius of the drop.

The initial conditions are

$$P(0, x) = P_{ini}, \quad O_2(0, \rho) = O_2^*, \quad N(0, \rho) = N_{ini} \quad (\text{A.16})$$

In the incubator 4 situation, the drops are long and cylindrical. We assume that the concentration fields have a cylindrical symmetry and depend only upon r which is the distance from the axis to the point under scrutiny. We neglect the end effect at the two extremities of the drop. In this case, the Laplacian operator is written:

$$\Delta = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial}{\partial r} \right) \quad (\text{A.17})$$

For the same reasons, we apply the same boundary conditions than in the incubator 3's situation.

$$\frac{\partial P}{\partial r}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial O_2}{\partial r}(t, 0) = 0, \quad \frac{\partial N}{\partial r}(t, 0) = 0, \quad (\text{A.18})$$

$$\text{for } r = 0 \quad (\text{A.19})$$

$$\frac{\partial P}{\partial r}(t, r) = 0, \quad O_2(t, r) = O_2^*, \quad \frac{\partial N}{\partial r}(t, r) = 0, \quad (\text{A.20})$$

$$\text{for } r = R_{cylinder} \quad (\text{A.21})$$

where $R_{cylinder}$ is the radius of the cylinder.

The initial conditions are

$$P(0, r) = P_{ini}, \quad O_2(0, r) = O_2^*, \quad N(0, r) = N_{ini} \quad (\text{A.22})$$

Annexe B

Description du système automatisé

B.1 Les éléments du système

L'application visée pour le dispositif implique la culture de microorganismes planctoniques, donc en suspension, dans un milieu de culture choisi, auquel une formulation de molécules à étudier peut être ajoutée en quantités variables. L'inoculum de référence est fixé à 10^5 UFC/mL de façon à être suffisamment élevé pour permettre un développement si les conditions sont favorables, mais sans être trop supérieur à des valeurs de population que l'on peut trouver comme contaminants ou comme souche résidente à éliminer dans des conditions industrielles réelles. *Escherichia coli* MC4100-YFP est utilisée comme souche d'étude pour les raisons suivantes: elle représente un type de microorganismes couramment retrouvé dans des contaminations en industrie, et elle possède la propriété de produire la molécule fluorescente GFP ("Green fluorescent protein") qui sert d'indicateur de population. La méthode de détection associée à ces cultures de façon à obtenir des suivis de population quantitatifs tout au long de la croissance est une donc mesure couplée d'absorbance et de fluorescence, comme décrite dans le Chapitre 2 de ce manuscrit.

De façon à assurer un niveau d'inoculation satisfaisant dans chaque incubateur, les cultures sont réalisées à l'aide du dispositif millifluidique décrit dans le Chapitre 2 de ce manuscrit. En effet, le volume des milli-incubateurs alors générés est d'environ $5 \cdot 10^{-6}$ L, ce qui correspond, avec un inoculum moyen de 10^5 UFC/mL, à 500 UFC par incubateur et garanti ainsi une bonne statistique d'inoculation.

La composition des incubateurs est régulée grâce aux flux d'injection de chaque composé dans le système millifluidique (Milieu de culture, Inoculum, Molécule 1, Molécule 2, etc...). Pour chaque composition, un train de milli-incubateurs est stocké dans un capillaire. Nous faisons le choix de remplir chaque tube par des gouttes (=milli-incubateurs) de composition identique et de ne faire varier la composition que d'un tube à l'autre. De cette façon, toutes les gouttes d'un même tube sont des répliquas.

Le maintien des conditions de croissance pour chaque incubateur, couplé aux mesures d'absorbance-fluorescence est assuré par un support cylindrique sur lequel les capillaires sont fixés. Les emplacements des capillaires sur le support sont munis de surfaces réfléchissantes afin d'améliorer la sensibilité des mesures. Le cylindre est entraîné sur un axe par un moteur pas à pas ce qui permet de placer les capillaires devant le système de détection les uns après les autres, tout en assurant une agitation douce pour éviter la sédimentation des bactéries aux temps longs. L'assemblage du cylindre, de l'axe et de son support, et du moteur d'entraînement sont isolés par une boîte thermostatée pour assurer le maintien en température des incubateurs. L'ensemble est supporté par une platine motorisée qui autorise un déplacement transversal par rapport au système d'acquisition, et permet ainsi une mesure tout au long de chaque capillaire, et donc sur chaque incubateur. Enfin, le système d'acquisition est fixe et se compose d'un objectif 10X relié à une source de lumière pilotable et à une caméra par le biais de "cubes" munis de filtres et de miroir pour permettre les mesures en réflexion. Un second moteur pas à pas aligne le cube adapté pour chaque type de mesure (absorbance ou fluorescence).

L'ensemble de ces éléments est supporté par un microscope qui assure les liaisons optiques, et le contrôle coordonné s'effectue par un PC via le logiciel MATLAB (Figure B.1).

B.2 Le schéma optique

Les mesures de population au cours du temps dans chaque incubateur requièrent une acquisition de fluorescence de l'échantillon ainsi que de l'absorbance.

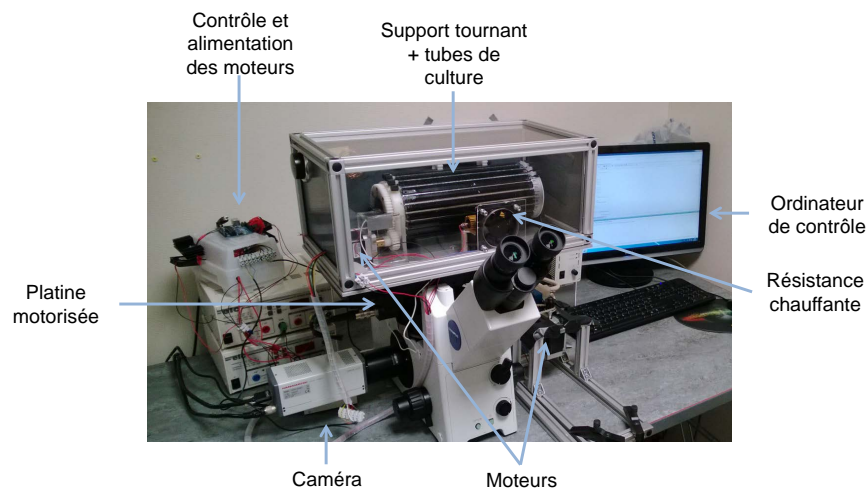


FIGURE B.1: Photographie du montage de suivi de croissance automatisé.

Le calcul de fluorescence décrit dans le Chapitre 2 s'effectue à partir des valeurs d'intensité lumineuse émise par la molécule GFP contenue dans l'échantillon à 520 nm, après avoir été illuminé à 488 nm. Expérimentalement, la source lumineuse émet une lumière sur une gamme de longueur d'onde couvrant les valeurs d'excitation (488 nm) et d'émission (520 nm) de fluorescence, il faut donc filtrer cette lumière. Pour cela, la lumière issue de la source est dirigée vers un cube de fluorescence. Ce dernier est équipé de deux filtres et d'un miroir dichroïque. Le premier filtre que la lumière traverse est un filtre passe-bande centré en 488 nm avec une fenêtre de plus ou moins 5 nm autour de cette valeur. Cette lumière filtrée rencontre ensuite un miroir dichroïque à 510 nm qui la dirige vers l'échantillon. Soit par illumination directe, soit après réflexion sur la surface réfléchissante placée sous les capillaires, une partie de cette lumière rencontre les molécules de GFP. Ces dernières absorbent alors une part de l'énergie de cette lumière, et réémettent un rayonnement à la longueur d'onde de 488 nm dans toutes les directions. La partie de ce rayonnement qui parvient jusqu'au miroir dichroïque cité précédemment le traverse cette fois, et rencontre alors le filtre passe-bande centré à 488 nm plus ou moins 10 nm qui filtre la lumière parasite issue de l'illumination, et ne laisse atteindre le détecteur de la caméra situé en aval que les rayonnements proches de 488 nm. Grâce à ce système de filtres et miroirs, la caméra peut mesurer précisément le nombre de photons émis par les molécules de GFP sans que le résultat ne soit perturbé par la lumière d'excitation. La Figure B.2 représente le schéma optique appliqué pour les mesures de fluorescence. Avec une lumière

d'excitation constante et/ou calibrée en temps réel, le rayonnement mesuré traduit le nombre de molécules de GFP présentes dans l'échantillon et donc le nombre de microorganismes. Pour que ce lien soit quantitatif, il faut cependant corriger les valeurs obtenues par l'absorbance du milieu au moment de la mesure.

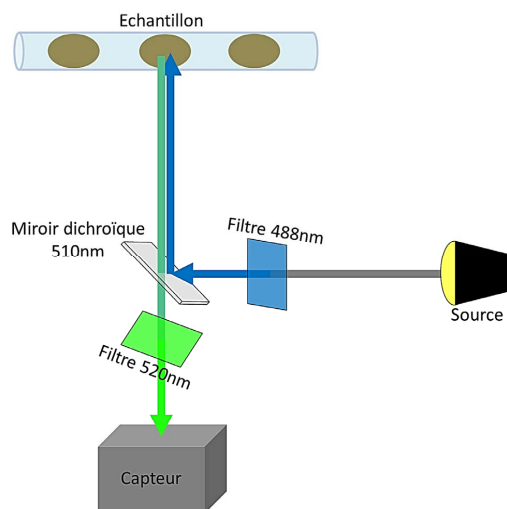


FIGURE B.2: Schéma optique pour les mesures de fluorescence.

La turbidité d'un milieu peut être due à différents phénomènes d'absorption / diffusion. Le résultat observable d'une hausse de turbidité, ou d'absorbance, est la réduction de la quantité de lumière capable de traverser un échantillon pour une intensité incidente fixe. Pour que les mesures de fluorescence soient quantitatives vis-à-vis de la population, il faut donc évaluer cette absorption de la lumière d'excitation et de la lumière émise afin de les corriger. Le principe de mesure de l'absorbance est similaire à celui de la mesure de fluorescence, excepté que dans le cas de l'absorbance, les filtres et miroir sont choisis de façon à ce que le capteur de la caméra reçoive la lumière ayant traversé l'échantillon (avec réflexion sur la surface réfléchissante derrière le capillaire) à une longueur d'onde donnée.

Idéalement, l'absorbance devrait être mesurée pour les longueurs d'onde d'excitation de fluorescence d'un côté, et d'émission de l'autre. Cependant, étant donné la proximité de ces deux valeurs, et après vérification expérimentale, il a été choisi de ne mesurer qu'une seule de ces valeurs en les considérant comme

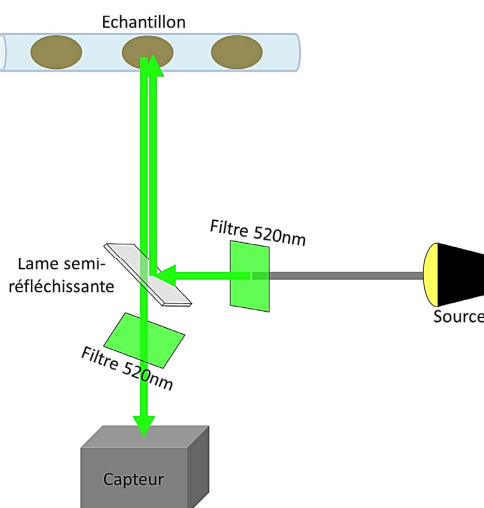


FIGURE B.3: Schéma optique pour les mesures d'absorbance.

identiques, à des fins de simplification expérimentale. Le cube utilisé pour les mesures d'absorbance est donc équipé de deux filtres passe-bande centrés à 520 nm et d'un miroir semi-réfléchissant achromatique. La Figure B.3 représente le schéma optique appliqué pour les mesures d'absorbance.

B.3 Le schéma de contrôle

Comme décrit dans le paragraphe B.1, les éléments du système sont coordonnés et contrôlés par ordinateur via le logiciel MATLAB. Nous rappelons ici les liens entre équipements et présentons ensuite le mode de contrôle de ces derniers.

La partie optique du montage pilotable par ordinateur se compose d'une source de lumière et d'une caméra. Les DEL constituant la lampe sont au nombre de quatre, chacune émettant dans une gamme de longueur d'onde différente, et peuvent être allumées indépendamment avec une intensité choisie entre 0 et 100%. L'acquisition de la caméra peut être démarrée et arrêtée par le biais de l'ordinateur, avec possibilité de réglage en temps réel de tous les paramètres d'acquisition, parmi lesquels la vitesse et le temps d'acquisition de chaque image, la compression, etc. . .

Les déplacements de la platine le long de l'axe des capillaires se font en imposant à une platine motorisée une accélération, vitesse, et distance de déplacement.

Enfin, la rotation du cylindre support et de la roue contenant les filtres absorbance/fluorescence est assurée par deux moteurs pas à pas. Ces derniers sont contrôlés par ordinateur au travers d'une carte électronique ARDUINO UNO et d'un circuit électrique adapté. L'avantage de ce type de moteur est d'être précisément contrôlable car la rotation s'effectue par pas de faible valeur angulaire. Les pas des moteurs utilisés pour ce montage sont de 1.8° . De plus, la rotation peut être imposée dans le sens horaire comme antihoraire, permettant par exemple des allers-et-venues entre le cube d'absorbance et de fluorescence. La liaison entre le premier moteur et le cylindre est assurée par un système d'engrenage, alors que la liaison entre le second moteur et la roue à filtres se fait par courroie. La Figure B.4 représente les différents éléments coordonnés pour permettre le suivi de croissance automatisé.

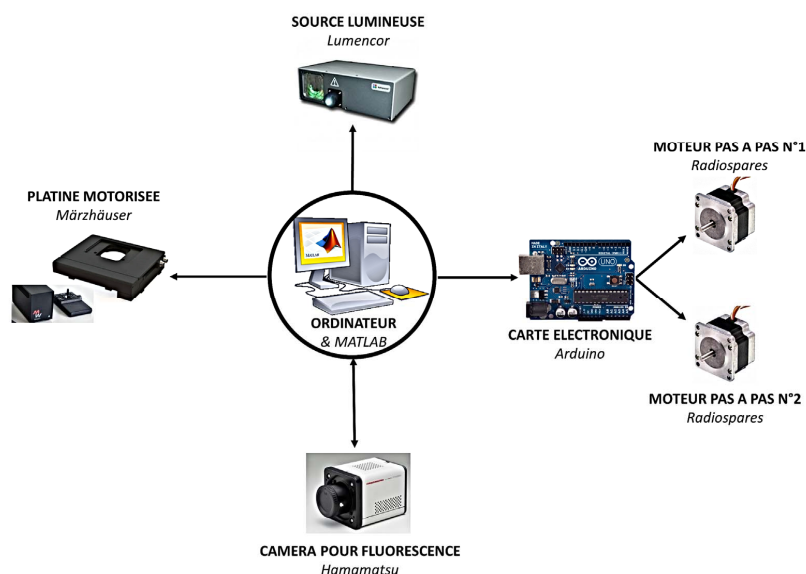


FIGURE B.4: Schéma d'organisation du contrôle des différents éléments du système automatisé.

Les possibilités offertes par ces différents éléments, ainsi que la coordination de l'ensemble par le logiciel MATLAB permet la réalisation de la séquence décrite ci-dessous et schématisée sur la Figure B.5.

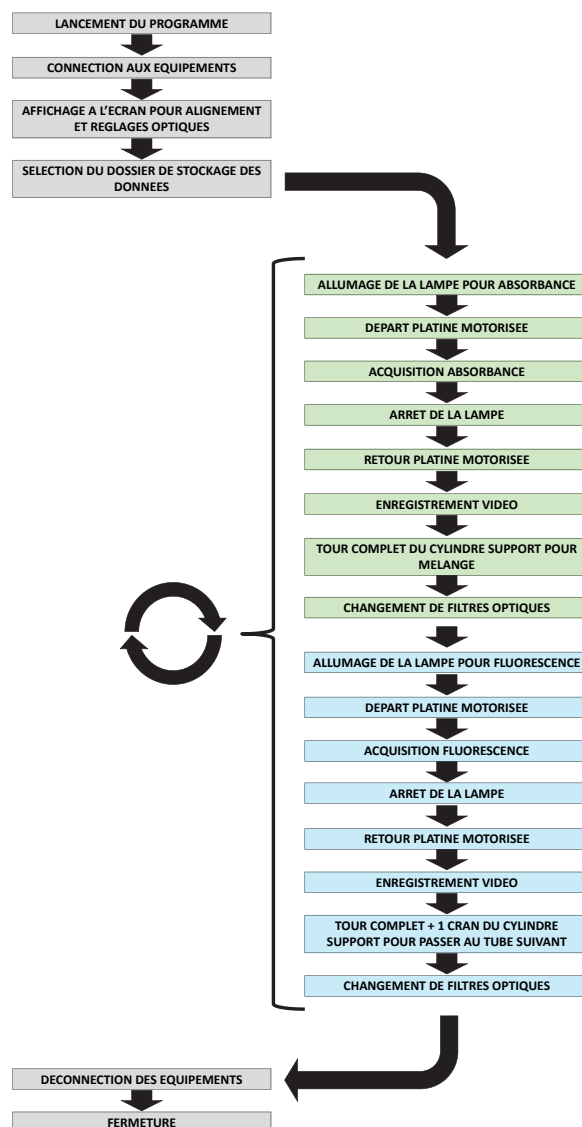


FIGURE B.5: Séquence de commandes pour le pilotage de l'acquisition d'absorbance / fluorescence sur le système automatisé.

Dans un premier temps, le logiciel de contrôle créé des connexions avec chacun des éléments via des ports de type USB ou RS232, autorisant le dialogue entre ordinateur et équipement, et assigne à tous les paramètres clés des valeurs choisies pour notre étude, et détaillés dans le Tableau B.1. Ensuite la lampe est allumée, le cube dédié à l'absorbance est mis en place (manuellement) et un aperçu de la caméra est affiché à l'écran. Cet affichage permet de régler visuellement l'alignement des capillaires avec le système d'acquisition et de faire la mise au

Équipement	Paramètre	Valeur	
		Absorbance	Fluorescence
Lampe	UV	0 %	0 %
	Cyan	3 %	0 %
	Vert	3 %	0 %
	Rouge	0 %	0 %
Caméra	Temps d'expo.	0.00001 s	0.00001 s
	Vitesse d'acq.	1 s ⁻¹	1 s ⁻¹
	Format	MJ2	MJ2
Platine	Accélération	1 mm.s ⁻²	1 mm.s ⁻²
	Vitesse	1 mm.s ⁻¹	1 mm.s ⁻¹
	Distance	15 cm	15 cm
Moteur	Vitesse	1 s ⁻¹	1 s ⁻¹

TABLEAU B.1: Paramètres par défaut des équipements pour le suivi de croissance automatisé

point sur les incubateurs. Une fois ces réglages effectués, la lampe est éteinte et l'aperçu fermé, et le dossier de stockage des données est sélectionné. L'acquisition démarre en suivant.

Les étapes décrites dans le paragraphe suivant sont répétées de capillaire en capillaire voisin tout au long de la durée du suivi de culture.

La lampe est allumée avec les paramètres adaptés pour l'absorbance. La platine démarre en même temps que l'acquisition par la caméra est lancée. Une fois le capillaire parcouru en entier, l'acquisition est interrompue, la lampe éteinte, et la platine repart à sa position initiale. La vidéo est stockée dans le dossier sélectionné précédemment afin de libérer la mémoire tampon pour l'acquisition suivante. Le premier moteur impose un tour complet du cylindre pour agitation et repositionne le même capillaire devant l'objectif. Le second moteur remplace le cube d'absorbance par celui dédié à la fluorescence. La lampe s'allume alors avec les paramètres adaptés à l'acquisition de fluorescence et l'acquisition se fait de la même façon que pour l'absorbance. Après l'enregistrement de la vidéo, le premier moteur fait faire un tour complet au cylindre support pour agitation puis le fait pivoter jusqu'à que le capillaire suivant se trouve face à l'objectif. Le cube d'absorbance remplace le filtre de fluorescence et le processus reprend au début de ce paragraphe.

Une fois le temps final atteint, les équipements sont déconnectés par le logiciel, l'acquisition s'arrête.

B.4 Les séquences de traitement

Les vidéos enregistrées au cours de l'acquisition contiennent les informations permettant d'obtenir les évolutions de population dans chaque incubateur. Cependant, elles doivent être analysées afin d'en retirer les données nécessaires.

Chaque vidéo est une série d'images, composées de pixels dont la valeur est proportionnelle au nombre de photons reçus au cours de l'acquisition. Ainsi, les pixels correspondant à des zones hors du capillaire ne présentent pas d'intérêt. Afin de réduire le volume de données, une phase de pré-traitement est donc appliquée à chaque vidéo de façon à conserver les valeurs associées uniquement aux pixels d'intérêt. Etant donné la taille importante de chaque vidéo (haute définition), cette étape peut être consommatrice de temps. Elle se fait donc en simultané des acquisitions de façon à ce que les données soient exploitables dès la fin de l'expérimentation.

Le programme de pré-traitement est lancé, de préférence, une fois que l'acquisition a été effectuée au moins une fois par capillaire. Après avoir défini le dossier dans lequel chercher les vidéos à traiter (correspondant au fichier d'enregistrement de la partie acquisition), le dossier dans lequel enregistrer les résultats du traitement, et le nombre de capillaires sur lesquels l'acquisition a été lancée, l'axe des capillaires est repéré manuellement sur les vidéos correspondantes à chaque première acquisition (si le pré-traitement est lancé avant que chaque première vidéo ait été acquise pour chaque capillaire, le programme attend la création de ce fichier dans le dossier source avant de proposer le repérage de l'axe). Cela permet de corriger les éventuels défauts de fabrication du système qui peuvent rendre la distance entre deux capillaires sensiblement différente de l'un à l'autre. Pour cela, la première image des vidéos des premières acquisitions de chaque capillaire est affichée à l'écran, et un curseur permet de repérer manuellement l'axe des capillaires les uns après les autres. La position de l'axe de chaque capillaire est stockée dans le programme et permet le traitement autonome de toutes les vidéos suivantes.

Ensuite, le programme vérifie régulièrement la présence de nouveaux fichiers à analyser dans le dossier source et, dans le cas où un ou des fichiers ont été créés, les analyses. Cette étape du pré-traitement consiste à ouvrir intégralement toute nouvelle vidéo créée, et à mesurer la moyenne d'intensité des pixels au centre de l'image, sur l'axe défini précédemment. Ainsi, à chaque image est associée une valeur d'intensité traduisant le nombre de photons moyens comptés dans l'axe du capillaire, dans la zone centrale de l'image. Après traitement de toute la série d'image, les intensités sont stockées sous forme d'un vecteur contenant autant d'éléments qu'il y avait d'images dans la vidéo. Ce vecteur est enregistré dans le dossier de résultats, la vidéo est fermée, et l'analyse reprend au début de ce paragraphe.

La Figure B.6 représente le processus de traitement des données brutes acquises par le système automatisé. Quand l'acquisition est terminée, le programme de pré-traitement peut également être arrêté, pour passer à la phase de traitement.

Les données récupérées à partir de la phase de traitement sont sous la forme d'une série de vecteurs, chaque vecteur correspondant à une acquisition, tantôt d'absorbance, tantôt de fluorescence. Le programme de traitement retrace ces vecteurs de façon à regrouper les vecteurs associés à chaque capillaire, mesurer l'absorbance d'une part, la fluorescence de l'autre, tout en dissociant les valeurs associées aux incubateurs de celles de la phase huile, pour arriver au profil d'évolution de population associé à chaque milli-incubateur.

Tout d'abord, les données issues du pré-traitement sont importées par le programme et associées au capillaire correspondant. Pour chaque capillaire, tous les profils d'absorbance multipliés par la fluorescence sont affichés simultanément. L'affichage de ces profils permet de repérer manuellement la position des incubateurs grâce notamment aux pics d'intensités qui caractérisent le passage de l'interface huile/eau. A chaque incubateur, on associe également la position du milieu de la portion d'huile juxtaposée à des fins de normalisation. En effet, l'huile ne subissant aucune modification au cours de l'expérimentation, elle fait une excellente référence pour les calculs d'absorbance. Ces positions sont enregistrées pour chaque capillaire.

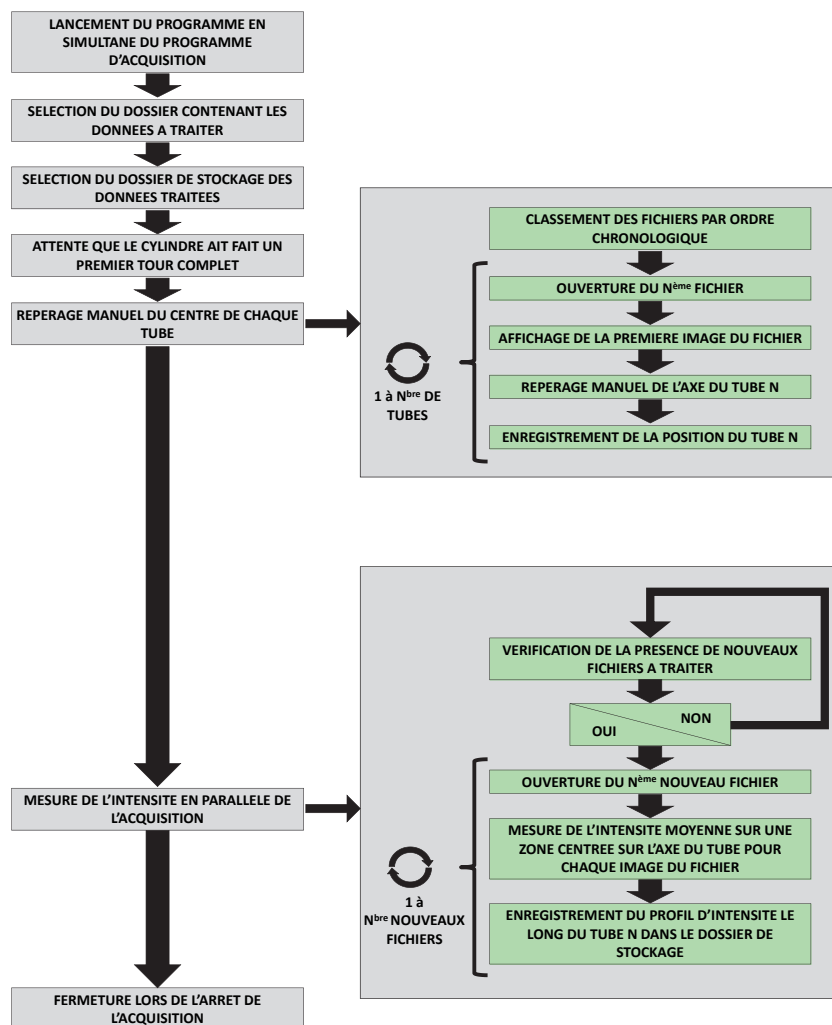


FIGURE B.6: Séquence de commandes pour le traitement des données acquises sur le système automatisé.

Le programme extrait ensuite les valeurs d'intensités associées à chaque incubateur, et pour chaque acquisition (c'est-à-dire chaque pas de temps). Les données extraites du capillaire de référence contenant du milieu de culture seul sont utilisées pour corriger les valeurs de fluorescence des autres capillaires, puis, les mesures de fluorescence sont corrigées par les valeurs d'absorbance afin d'obtenir les profils finaux d'évolution de population quantitatifs au cours du temps. La Figure B.7 représente le processus de traitement des données permettant l'obtention des courbes de croissance associées à chaque mini-incubateur.

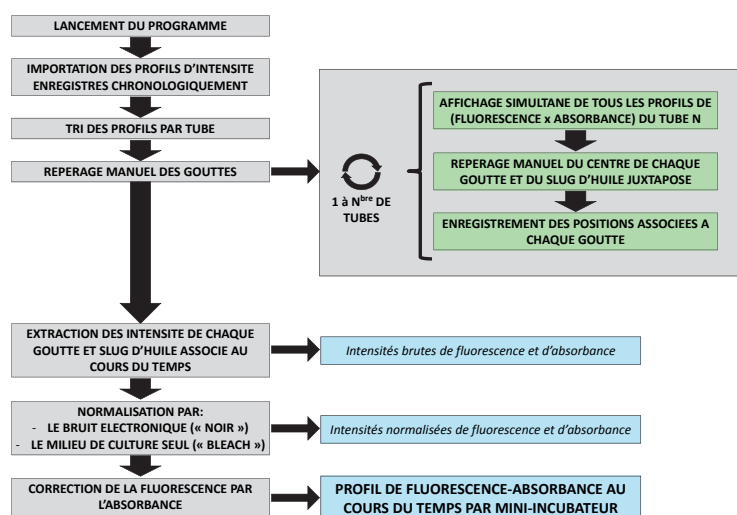


FIGURE B.7: Traitement des profils d'intensité obtenus par analyse des données vidéos brutes pour l'obtention de courbes de croissance pour chaque mini-incubateur au cours du temps.

Références bibliographiques

- [1] Larysa Baraban, Fabien Bertholle, Merijn LM Salverda, Nicolas Bremond, Pascal Panizza, Jean Baudry, J Arjan GM de Visser, and Jérôme Bibette. Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a chip*, 11(23):4057–4062, 2011.
- [2] Nate J Cira, Jack Y Ho, Megan E Dueck, and Douglas B Weibel. A self-loading microfluidic device for determining the minimum inhibitory concentration of antibiotics. *Lab on a Chip*, 12(6):1052–1059, 2012.
- [3] Rika Takagi, Junji Fukuda, Keiji Nagata, Yutaka Yawata, Nobuhiko Nomura, and Hiroaki Suzuki. A microfluidic microbial culture device for rapid determination of the minimum inhibitory concentration of antibiotics. *Analyst*, 138(4):1000–1003, 2013.
- [4] Orit Gefen and Nathalie Q Balaban. The moore’s law of microbiology—towards bacterial culture miniaturization with the micro-petri chip. *Trends in biotechnology*, 26(7):345–347, 2008.
- [5] Antony van Leeuwenhoek. Part of a letter from mr antony van leeuwenhoek, frs concerning green weeds growing in water, and some animalcula found about them. *Philosophical Transactions*, 23(277-288):1304–1311, 1702.
- [6] Jacques Monod. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, 3(1):371–394, 1949.
- [7] Thomas Dale Brock, Michael T Madigan, John M Martinko, and Daniel Prieur. *Biologie des micro-organismes*. Pearson Education France, 2007.
- [8] Francis C Moore and Leon R Perkinson. Hydrogen peroxide vapor sterilization method, September 25 1979. US Patent 4,169,123.
- [9] Process for bulk sterilization, minimizing chemical and physical damage, December 18 1973. US Patent 3,779,706.

- [10] VICTOR HENRI. Apparatus for sterilizing liquids by means of ultra violet rays, November 6 1923. US Patent 1,473,095.
- [11] Emil R Schipanski. Autoclave, October 24 1950. US Patent 2,526,974.
- [12] CHARLES R PHILLIPS and Saul Kaye. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide i. review. *American Journal of Epidemiology*, 50(3):270–279, 1949.
- [13] Francois ZUBER, Michel BITON, and Antoine CAZIER. Conception et validation des barèmes d'appertisation. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2(F2032), 2008.
- [14] Delphine VERJAT-TRANNOY, Cyril VADROT, Corinne DANAN, and Alain RACHON. Analyses en microbiologie: Produits stériles. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, (P3354), 2006.
- [15] H Meyer, Othmar Kappeli, and Armin Fiechter. Growth control in microbial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, 39(1):299–319, 1985.
- [16] Mac H McCrady. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *The Journal of Infectious Diseases*, pages 183–212, 1915.
- [17] Wallace Bt Coulter. Itteajls fofe counting mrtictes, October 20 1953. US Patent 2,656,508.
- [18] Mack J Fulwyler. Electronic separation of biological cells by volume. *Science*, 150(3698):910–911, 1965.
- [19] Howard M Shapiro. *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons, 2005.
- [20] Satyajit D Sarker, Lutfun Nahar, and Yashodharan Kumarasamy. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4):321–324, 2007.
- [21] Munetaka Ishiyama, Hideyuki Tominaga, Masanobu Shiga, Kazumi Sasamoto, Yosuke Ohkura, Keiyu Ueno, et al. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11):1518–1520, 1996.

- [22] Russell D Petty, Lesley A Sutherland, Elizabeth M Hunter, and Ian A Cree. Comparison of mtt and atp-based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence*, 10(1):29–34, 1995.
- [23] JT Holah, JH Taylor, DJ Dawson, and KE Hall. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of listeria monocytogenes and escherichia coli. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1):111S–120S, 2002.
- [24] Maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments : principales normes. *Techniques de l'ingénieur Agroalimentaire : risques, sécurité, qualité et environnement*, base documentaire : TIB427DUO.(f1109), 2014.
- [25] Xavier Fernandez, Florence Merck, and Audrey Kerdudo. Conservateurs pour cosmétiques généralités et conservateurs antimicrobiens. *Techniques de l'ingénieur Élaboration des formulations*, base documentaire : TIB335DUO. (ref. article : j2284), 2014.
- [26] JS Baker and LY Dudley. Biofouling in membrane systems—a review. *Desalination*, 118(1):81–89, 1998.
- [27] Ana Beloqui, Pablo Domínguez de María, Peter N Golyshin, and Manuel Ferrer. Recent trends in industrial microbiology. *Current opinion in microbiology*, 11(3):240–248, 2008.
- [28] Jon Clardy, Michael A Fischbach, and Christopher T Walsh. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature biotechnology*, 24(12):1541–1550, 2006.
- [29] Anne-Gaëlle Planson, Pablo Carbonell, Ioana Grigoras, and Jean-Loup Faulon. Engineering antibiotic production and overcoming bacterial resistance. *Biotechnology journal*, 6(7):812–825, 2011.
- [30] Alexander Fleming. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of b. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10(3):226, 1929.
- [31] N Abdel-Raouf, AA Al-Homaidan, and IBM Ibraheem. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3):257–275, 2012.

- [32] CP Leslie Grady Jr, Glen T Daigger, Nancy G Love, Carlos DM Filipe, CP Leslie Grady, et al. *Biological wastewater treatment*. Number Ed. 3. IWA Publishing, 2011.
- [33] Mark W Tenney and Werner Stumm. Chemical flocculation of microorganisms in biological waste treatment. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, pages 1370–1388, 1965.
- [34] Perry L McCarty. Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public works*, 95(9):107–112, 1964.
- [35] Alonzo W Lawrence and Perry L McCarty. Unified basis for biological treatment design and operation. *journal of the Sanitary Engineering Division*, 96(3):757–778, 1970.
- [36] R Boopathy. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1):63–67, 2000.
- [37] Seth Dunn. Hydrogen futures: toward a sustainable energy system. *International journal of hydrogen energy*, 27(3):235–264, 2002.
- [38] Debabrata Das and T Nejat Veziroglu. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1):13–28, 2001.
- [39] Peer M Schenk, Skye R Thomas-Hall, Evan Stephens, Ute C Marx, Jan H Mussnug, Clemens Posten, Olaf Kruse, and Ben Hankamer. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1(1):20–43, 2008.
- [40] Bruce E Logan. *Microbial fuel cells*. John Wiley and Sons, 2008.
- [41] Mary E Lidstrom and Deirdre R Meldrum. Life-on-a-chip. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2):158–164, 2003.
- [42] Satoshi Ishii, Kanako Tago, and Keishi Senoo. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5):1281–1292, 2010.
- [43] Joshua S Marcus, W French Anderson, and Stephen R Quake. Microfluidic single-cell mrna isolation and analysis. *Analytical chemistry*, 78(9):3084–3089, 2006.

- [44] Jian Gao, Xue-Feng Yin, and Zhao-Lun Fang. Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip. *Lab on a Chip*, 4(1):47–52, 2004.
- [45] Sarah Köster, Francesco E Angile, Honey Duan, Jeremy J Agresti, Anton Wintner, Christian Schmitz, Amy C Rowat, Christoph A Merten, Dario Pisignano, Andrew D Griffiths, et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab on a Chip*, 8(7):1110–1115, 2008.
- [46] Douglas B Weibel, Willow R DiLuzio, and George M Whitesides. Micro-fabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3):209–218, 2007.
- [47] Jürgen Mairhofer, Kriemhilt Roppert, and Peter Ertl. Microfluidic systems for pathogen sensing: a review. *Sensors*, 9(6):4804–4823, 2009.
- [48] Jean-Christophe Baret, Valérie Taly, Michael Ryckelynck, Christoph A Merten, and Andrew D Griffiths. Gouttes et émulsions: Criblage à très haut débit en biologie. *MS. Médecine sciences*, 25(6-7):627–632, 2009.
- [49] Mark Schena, Dari Shalon, Ronald W Davis, and Patrick O Brown. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science*, 270(5235):467–470, 1995.
- [50] Michael J Heller. Dna microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual review of biomedical engineering*, 4(1):129–153, 2002.
- [51] David Gerhold, Thomas Rushmore, and C Thomas Caskey. Dna chips: promising toys have become powerful tools. *Trends in biochemical sciences*, 24(5):168–173, 1999.
- [52] Bertrand Lemieux, Asaph Aharoni, and Mark Schena. Overview of dna chip technology. *Molecular Breeding*, 4(4):277–289, 1998.
- [53] David J Lockhart and Elizabeth A Winzeler. Genomics, gene expression and dna arrays. *nature*, 405(6788):827–836, 2000.
- [54] Penelope A Bryant, Deon Venter, Roy Robins-Browne, and Nigel Curtis. Chips with everything: Dna microarrays in infectious diseases. *The Lancet infectious diseases*, 4(2):100–111, 2004.

- [55] Francesca Bettazzi, Fausto Lucarelli, Ilaria Palchetti, Francesca Berti, Giovanna Marrazza, and Marco Mascini. Disposable electrochemical dna-array for pcr amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. *Analytica chimica acta*, 614(1):93–102, 2008.
- [56] George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373, 2006.
- [57] Changqing Yi, Cheuk-Wing Li, Shenglin Ji, and Mengsu Yang. Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Analytica Chimica Acta*, 560(1):1–23, 2006.
- [58] Helene Andersson and Albert Van den Berg. Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 92(3):315–325, 2003.
- [59] Jamil El-Ali, Peter K Sorger, and Klavs F Jensen. Cells on chips. *Nature*, 442(7101):403–411, 2006.
- [60] Yingying Wang, Frederik Hammes, Karen De Roy, Willy Verstraete, and Nico Boon. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in biotechnology*, 28(8):416–424, 2010.
- [61] Susan Z Hua and Thomas Pennell. A microfluidic chip for real-time studies of the volume of single cells. *Lab on a Chip*, 9(2):251–256, 2009.
- [62] John L Tan, Joe Tien, Dana M Pirone, Darren S Gray, Kiran Bhadriraju, and Christopher S Chen. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4):1484–1489, 2003.
- [63] Aaron Novick and Leo Szilard. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(12):708, 1950.
- [64] Erik Postma, CORNELIS Verduyn, W ALEXANDER Scheffers, and JOHANNES P Van Dijken. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 55(2):468–477, 1989.
- [65] DANIEL E Dykhuizen and DANIEL L Hartl. Selection in chemostats. *Microbiological Reviews*, 47(2):150, 1983.

- [66] Frederick K Balagaddé, Lingchong You, Carl L Hansen, Frances H Arnold, and Stephen R Quake. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 309(5731):137–140, 2005.
- [67] Alex Groisman, Caroline Lobo, HoJung Cho, J Kyle Campbell, Yann S Dufour, Ann M Stevens, and Andre Levchenko. A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. *Nature methods*, 2(9):685–689, 2005.
- [68] Kevin S Lee, Paolo Boccazzi, Anthony J Sinskey, and Rajeev J Ram. Microfluidic chemostat and turbidostat with flow rate, oxygen, and temperature control for dynamic continuous culture. *Lab on a Chip*, 11(10):1730–1739, 2011.
- [69] Denis Cottinet. *Diversité phénotypique et adaptation chez Escherichia coli étudiées en millifluidique digitale*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2013.
- [70] Yunfang Tang, Mingzhe Gan, Yifei Xie, Xudong Li, and Liwei Chen. Fast screening of bacterial suspension culture conditions on chip. *Lab on a Chip*, 2013.
- [71] Colin J Ingham, Ad Sprenkels, Johan Bomer, Douwe Molenaar, Albert van den Berg, Johan ET van Hylckama Vlieg, and Willem M de Vos. The micro-petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46):18217–18222, 2007.
- [72] Matthew Hegreness, Noam Shores, Daniel Hartl, and Roy Kishony. An equivalence principle for the incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science*, 311(5767):1615–1617, 2006.
- [73] Arthur L Koch and Elvera Ehrenfeld. The size and shape of bacteria by light scattering measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 165(2):262–273, 1968.
- [74] Philip J Wyatt. Differential light scattering: a physical method for identifying living bacterial cells. *Applied optics*, 7(10):1879–1896, 1968.

- [75] Xie Chang-Li, Tang Hou-Kuhan, Song Zhau-Hua, Qu Song-Sheng, Liao Yao-Ting, and Liu Hai-Shui. Microcalorimetric study of bacterial growth. *Thermochimica Acta*, 123:33–41, 1988.
- [76] Marta Romano. *Development of a non contact calorimeter in isoperibolic millifluidic systems using InfraRed Thermography: applied to biphasic flows*. PhD thesis, Bordeaux 1, 2013.
- [77] Olga Lyandres, Jonathan M Yuen, Nilam C Shah, Richard P VanDuyne, Joseph T Walsh Jr, and Matthew R Glucksberg. Progress toward an in vivo surface-enhanced raman spectroscopy glucose sensor. *Diabetes technology & therapeutics*, 10(4):257–265, 2008.
- [78] Douglas A Stuart, Chanda Ranjit Yonzon, Xiaoyu Zhang, Olga Lyandres, Nilam C Shah, Matthew R Glucksberg, Joseph T Walsh, and Richard P Van Duyne. Glucose sensing using near-infrared surface-enhanced raman spectroscopy: gold surfaces, 10-day stability, and improved accuracy. *Analytical Chemistry*, 77(13):4013–4019, 2005.
- [79] L Collins and Scott G Franzblau. Microplate alamar blue assay versus bactec 460 system for high-throughput screening of compounds against mycobacterium tuberculosis and mycobacterium avium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(5):1004–1009, 1997.
- [80] John O'brien, Ian Wilson, Terry Orton, and François Pognan. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17): 5421–5426, 2000.
- [81] Mingzhe Gan, Jing Su, Jing Wang, Hongkai Wu, and Liwei Chen. A scalable microfluidic chip for bacterial suspension culture. *Lab on a Chip*, 11(23): 4087–4092, 2011.
- [82] Yutaka Yawata, Kensuke Toda, Erika Setoyama, Junji Fukuda, Hiroaki Suzuki, Hiroo Uchiyama, and Nobuhiko Nomura. Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(3):377–380, 2010.
- [83] P. Oswald and M.S. Jean. *Rhéophysique: ou comment coule la matière*. Collection Échelles. Belin, 2005. ISBN 9782701139692.

- [84] Howard A Stone, Abraham D Stroock, and Armand Ajdari. Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 36:381–411, 2004.
- [85] Pierre Guillot and Annie Colin. Stability of parallel flows in a microchannel after a T junction. *Physical Review E*, 72(6):066301, 2005.
- [86] Wilfried Engl, Rénal Backov, and Pascal Panizza. Controlled production of emulsions and particles by milli- and microfluidic techniques. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4):206–216, 2008.
- [87] Nicolas Lorber, Flavie Sarrazin, Pierre Guillot, Pascal Panizza, Annie Colin, Bertrand Pavageau, Cindy Hany, Patrick Maestro, Samuel Marre, Thomas Delclos, et al. Some recent advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process: Applications in chemistry and high-pressure microflows. *Lab on a Chip*, 11(5):779–787, 2011.
- [88] Shia-Yen Teh, Robert Lin, Lung-Hsin Hung, and Abraham P Lee. Droplet microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(2):198–220, 2008.
- [89] Andreas Manz, D Jed Harrison, Elisabeth MJ Verpoorte, James C Fettinger, Aran Paulus, Hans Lüdi, and H Michael Widmer. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography A*, 593(1):253–258, 1992.
- [90] D Jed Harrison, Karl Fluri, Kurt Seiler, Zhonghui Fan, Carlo S Effenhauser, Andreas Manz, et al. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 261:895–895, 1993.
- [91] Joel Voldman, Martha L Gray, and Martin A Schmidt. Microfabrication in biology and medicine. *Annual review of biomedical engineering*, 1(1):401–425, 1999.
- [92] J Cooper McDonald and George M Whitesides. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of chemical research*, 35(7):491–499, 2002.
- [93] Janelle R Anderson, Daniel T Chiu, Rebecca J Jackman, Oksana Chernivskaya, J Cooper McDonald, Hongkai Wu, Sue H Whitesides, and George M

- Whitesides. Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in pdms by rapid prototyping. *Analytical chemistry*, 72(14): 3158–3164, 2000.
- [94] LJ Guerin, M Bossel, Michel Demierre, S Calmes, and Philippe Renaud. Simple and low cost fabrication of embedded micro-channels by using a new thick-film photoplastic. In *Transducers*, volume 97, pages 1419–1422, 1997.
- [95] So Hyun Kim, Yoonsun Yang, Mihee Kim, S-W Nam, K-M Lee, Nae Yoon Lee, YOUN SANG Kim, and Sungsu Park. Simple route to hydrophilic microfluidic chip fabrication using an ultraviolet (uv)-cured polymer. *Advanced Functional Materials*, 17(17):3493–3498, 2007.
- [96] Stefano Begolo, Guillaume Colas, Jean-Louis Viovy, and Laurent Malaquin. New family of fluorinated polymer chips for droplet and organic solvent microfluidics. *Lab on a Chip*, 11(3):508–512, 2011.
- [97] Holger Becker and Laurie E Locascio. Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 56(2):267–287, 2002.
- [98] Remi Dreyfus, Patrick Tabeling, and Herve Willaime. Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels. *Physical review letters*, 90(14):144505, 2003.
- [99] Kangning Ren, Wen Dai, Jianhua Zhou, Jing Su, and Hongkai Wu. Whole-tesflon microfluidic chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20):8162–8166, 2011.
- [100] Jean-Christophe Baret. Surfactants in droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 12(3):422–433, 2012.
- [101] C Holtze, AC Rowat, JJ Agresti, JB Hutchison, FE Angile, CHJ Schmitz, S Köster, H Duan, KJ Humphry, RA Scanga, et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, 8(10):1632–1639, 2008.
- [102] Yousr Skhiri, Philipp Gruner, Benoît Semin, Quentin Brosseau, Deniz Pekin, Linas Mazutis, Victoire Goust, Felix Kleinschmidt, Abdeslam El Harrak, J Brian Hutchison, et al. Dynamics of molecular transport by surfactants in emulsions. *Soft Matter*, 8(41):10618–10627, 2012.

- [103] Shelley L Anna, Nathalie Bontoux, and Howard A Stone. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied physics letters*, 82(3):364–366, 2003.
- [104] Byungwook Ahn, Kangsun Lee, Hun Lee, Rajagopal Panchapakesan, Linfeng Xu, Jing Xu, and Kwang W Oh. Guiding, distribution, and storage of trains of shape-dependent droplets. *Lab on a Chip*, 11(22):3915–3918, 2011.
- [105] Saleema Saleh-Lakha and Jack T Trevors. Perspective: Microfluidic applications in microbiology. *Journal of microbiological methods*, 82(1):108–111, 2010.
- [106] Richard Barry and Dimitri Ivanov. Microfluidics in biotechnology. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1):2, 2004.
- [107] Eric Brouzes, Martina Medkova, Neal Savenelli, Dave Marran, Mariusz Twardowski, J Brian Hutchison, Jonathan M Rothberg, Darren R Link, Norbert Perrimon, and Michael L Samuels. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34):14195–14200, 2009.
- [108] James Q Boedicker, Liang Li, Timothy R Kline, and Rustem F Ismagilov. Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(8):1265–1272, 2008.
- [109] Bong Geun Chung, Lisa A Flanagan, Seog Woo Rhee, Philip H Schwartz, Abraham P Lee, Edwin S Monuki, and Noo Li Jeon. Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab on a Chip*, 5(4):401–406, 2005.
- [110] Arnold L Demain. Industrial microbiology. *Science*, 214(4524):987–995, 1981.
- [111] Logan Christenson and Ronald Sims. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, 29(6):686–702, 2011.
- [112] Kevin Shao-Kwan Lee, P Boccazzi, AJ Sinskey, and RJ Ram. *Microscale controlled continuous cell culture*, volume 72. 2011.

- [113] Jin Hwan Park, Sang Yup Lee, Tae Yong Kim, and Hyun Uk Kim. Application of systems biology for bioprocess development. *Trends in biotechnology*, 26(8):404–412, 2008.
- [114] Michael B Elowitz, Arnold J Levine, Eric D Siggia, and Peter S Swain. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584):1183–1186, 2002.
- [115] SKO Ntwampe, CC Williams, and MS Sheldon. Water-immiscible dissolved oxygen carriers in combination with pluronic f 68 in bioreactors. *African Journal of Biotechnology*, 9(8), 2010.
- [116] Heladia Salgado, Alberto Santos-Zavaleta, Socorro Gama-Castro, Martín Peralta-Gil, Mónica I Peñaloza-Spínola, Agustino Martínez-Antonio, Peter D Karp, and Julio Collado-Vides. The comprehensive updated regulatory network of escherichia coli k-12. *BMC bioinformatics*, 7(1):5, 2006.
- [117] Aurelia Battesti, Nadim Majdalani, and Susan Gottesman. The rpoS-mediated general stress response in escherichia coli*. *Annual review of microbiology*, 65:189–213, 2011.
- [118] Florence Wisniewski-Dyé and Ludovic Vial. Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(4):493–515, 2008.
- [119] Hubertus JE Beaumont, Jenna Gallie, Christian Kost, Gayle C Ferguson, and Paul B Rainey. Experimental evolution of bet hedging. *Nature*, 462(7269):90–93, 2009.
- [120] Aaron Novick and Leo Szilard. Description of the chemostat. *Science*, 112(2920):715–716, 1950.
- [121] Audrey Allion. *Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides: mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens*. PhD thesis, ENSIA (AgroParisTech), 2004.
- [122] John Gillatt. Methods for the efficacy testing of industrial biocides—1. evaluation of wet-state preservatives. *International biodeterioration*, 27(4):383–394, 1991.

- [123] Rijkelt Beumer, Sally F Bloomfield, Martin Exner, Gaetano M Fara, Kumar Jyoti Nath, and Elizabeth Scott. Microbial resistance and biocides. In *A review by the International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH)*, 2000.