



**HAL**  
open science

# Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique

M Édouard Duliège

► **To cite this version:**

M Édouard Duliège. Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique. Matière Molle [cond-mat.soft]. UPMC - Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 2017. Français. NNT: . tel-02512611

**HAL Id: tel-02512611**

**<https://theses.hal.science/tel-02512611v1>**

Submitted on 19 Mar 2020

**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.

CONFIDENTIEL



## Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

*Spécialité* Physico-chimie des Matériaux  
(École doctorale n° 388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre)

Présentée par

**M. Édouard Duliège**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

---

# Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique

---

Soutenance à huis clos prévue le 27 janvier 2017 devant le jury composé de :

M. Fernando LEAL CALDERON	Rapporteur
M. Jérémy PRUVOST	Rapporteur
Mme. Valérie PICHON	Examinatrice
M. Mathieu GOUTAYER	Examineur
M. Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M. Jean BAUDRY	Invité



CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

# Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

*Spécialité* Physico-chimie des Matériaux  
(École doctorale n° 388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre)

Présentée par

**M. Édouard Duliège**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie**

Thèse réalisée au sein du Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés (LCMD), Institut  
Chimie Biologie et Innovation (CBI) - ESPCI ParisTech / CNRS-UMR8231 / PSL\* Research  
University  
10 rue Vauquelin, 75005 Paris.

---

## Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique

---

Soutenance à huis clos prévue le 27 janvier 2017 devant le jury composé de :

M. Fernando LEAL CALDERON	Rapporteur
M. Jérémie PRUVOST	Rapporteur
Mme. Valérie PICHON	Examinatrice
M. Mathieu GOUTAYER	Examineur
M. Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M. Jean BAUDRY	Invité

CONFIDENTIEL

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Les bioprocédés et l'encapsulation dans l'industrie</b>	<b>16</b>
1.1	Les bioprocédés : depuis l'Antiquité jusqu'à demain . . . . .	17
1.1.1	Définition et historique . . . . .	17
1.1.2	Les bioprocédés supplantés par la chimie de synthèse . . . . .	19
1.1.3	Quelles plus-values pour quels défis ? . . . . .	20
1.2	L'encapsulation pour la cosmétique et au laboratoire . . . . .	21
1.2.1	Bénéfices de l'encapsulation . . . . .	21
1.2.2	Méthodes de production de capsules d'alginate au laboratoire . . . . .	22
1.3	Les microalgues et leur intérêt en cosmétique . . . . .	27
1.3.1	Généralités sur les microalgues . . . . .	27
1.3.2	Utilisation en cosmétique et en alimentaire . . . . .	28
1.3.3	Choix du micro-organisme de travail . . . . .	30
1.4	Conclusion . . . . .	35
<b>2</b>	<b>Encapsulation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>36</b>
2.1	Adaptation de la technologie : capsules d'alginate produites par jetting . . . . .	37
2.1.1	Adaptation du procédé . . . . .	37
2.1.2	Adaptation des milieux de culture . . . . .	41
2.1.3	Impact des milieux élaborés sur <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	46
2.1.4	Conclusion . . . . .	53
2.2	Encapsulation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	54
2.2.1	Illustration du procédé . . . . .	54
2.2.2	Suivi de croissance en capsule . . . . .	57
2.2.3	Concentration dans les capsules . . . . .	66
2.2.4	Conclusion . . . . .	72
2.3	Décontamination spécifique de la phase continue . . . . .	72
2.3.1	Moyens classiques de décontamination . . . . .	73
2.3.2	Utilisation de poly-L-lysine pour décontaminer spécifiquement la phase continue . . . . .	74
2.3.3	Conclusion . . . . .	78
2.4	Apport des capsules pour la production de lipides et pour les bio-procédés en général . . . . .	78

## CONFIDENTIEL

2.4.1	Sécrétion de lipides en suspension . . . . .	78
2.4.2	Production de lipides par des microalgues encapsulées . . . . .	81
2.4.3	Simplification des bio-procédés grâce aux capsules . . . . .	83
2.4.4	Conclusion et perspectives . . . . .	89
2.5	Conclusion . . . . .	90
<b>3</b>	<b>Screening combinatoire</b>	<b>92</b>
3.1	Séquences des conditions de culture pour les bio-procédés . . . . .	93
3.1.1	Importance et techniques actuelles de criblage . . . . .	93
3.1.2	Le split-pool : un outil parfait pour cribler des séquences de conditions de culture . . . . .	95
3.1.3	Vue d'ensemble du procédé . . . . .	98
3.1.4	Conclusion . . . . .	99
3.2	Marquage de capsules : enjeux et avantages pour le criblage combinatoire . . . . .	99
3.2.1	Apport des capsules . . . . .	99
3.2.2	Enjeu : le marquage . . . . .	103
3.3	Marquage des capsules avec des colloïdes . . . . .	106
3.3.1	Adsorption de colloïdes sur les capsules grâce à des liaisons faibles : preuve de concept avec billes magnétiques . . . . .	106
3.3.2	Utilisation de Quantum Dots . . . . .	115
3.3.3	Utilisation de particules de silice fluorescentes . . . . .	119
3.4	Conclusion . . . . .	123
<b>A</b>	<b>Annexes</b>	<b>127</b>
A.1	Milieus de culture . . . . .	127
A.1.1	TAP . . . . .	127
A.1.2	Minimum . . . . .	128
A.1.3	NO . . . . .	129
A.1.4	RCCM . . . . .	130
A.1.5	MCCM . . . . .	131
A.1.6	N0CCM . . . . .	132
	<b>Bibliographie</b>	<b>134</b>

# Table des figures

1.1	Procédé de fabrication de capsules d'alginate à cœur liquide et à fine membrane. Crédit Leslie Rolland. . . . .	23
1.2	Quelques exemples de produits cosmétiques à base de capsules, fabriqués par Capsum. . . . .	24
1.3	Fabrication de capsules d'alginate à cœur liquide et à fine membrane, monodisperses et de taille submillimétrique. Crédit Hugo Doméjean. . . . .	26
1.4	Phylogénétique simplifiée des microalgues. . . . .	27
1.5	La récolte et le séchage de la Spiruline au bord du Lac Tchad, rapport de la FAO « The Future is an Ancient Lake », 2004. . . . .	28
1.6	Une vision des molécules d'intérêt sécrétées par les microalgues. Crédit Rosenberg et al., Current Opinion in Biotechnology, 2008. . . . .	29
1.7	Structure cellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , représentant le noyau central (N) avec le nucléole (Nu), les deux flagelles isoformes (F), le chloroplaste (C) avec les stigma (E), le pyrénoïde contenant de l'amidon (P) et les mitochondries (M). De plus, il est possible de distinguer la vésicule du Golgi vesicle (G), des grains d'amidon (S) et des vacuole (V). Extrait de Nickelsen and Kück (2000). . . . .	32
1.8	La mitose chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	33
2.1	Suivi de la pasteurisation des solutions de polymères à 60°C ; Alginate : mélange 50/50 TAP et Alginate 1.7% + SDS 0,5 mM ; Cellulose : mélange 50/50 TAP et Cellulose 1%. Au bout de 4 jours, des contaminations se développent, le procédé n'est pas satisfaisant. . . . .	39
2.2	Suivi de la pasteurisation des solutions de polymères à 65°C ; Alginate : mélange 50/50 TAP et Alginate 1.7% + SDS 0,5 mM ; Cellulose : mélange 50/50 TAP et Cellulose 1%. Les polymères pasteurisés 60 minutes à 65°C restent stériles plus de trois semaines, le procédé est satisfaisant. . . . .	40
2.3	Schéma observation de billes au microscope. . . . .	42
2.4	Évolution de billes d'alginate dans un tampon phosphate. . . . .	42
2.5	Évolution de billes d'alginate dans du TAP. . . . .	44
2.6	Gonflement de billes d'alginate dans le TAP et le Minimum, exprimé en pourcentage du rayon initial. . . . .	44
2.7	Évolution de billes d'alginate dans du RCCM, à potentiel chimique constant. . . . .	46

CONFIDENTIEL

2.8	Gonflement de billes d'alginate dans le RCCM et le MCCM, exprimé en pourcentage du rayon initial. . . . .	46
2.9	Mesure d'absorbance. . . . .	48
2.10	Mesure de DO en flasque. . . . .	49
2.11	Comptage au cytomètre; les algues sont repérées grâce à la diffusion de lumière (FSC/SSC) et leur signal de fluorescence (675 nm). . . . .	50
2.12	Courbe de calibration; les points rouges correspondent au mesure du blanc et le triangle vert à la LOD. . . . .	51
2.13	Croissance de WTS 24- dans le TAP et le RCCM. . . . .	52
2.14	Phase exponentielle WTS 24- dans le TAP et le RCCM. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration. . . . .	53
2.15	Dispositif de fabrication de capsules. . . . .	55
2.16	Effet de l'électrode sur le jet. . . . .	56
2.17	Capsules vides observées au microscope optique, grossissement 4x. . . . .	57
2.18	Après collecte, les capsules sont lavées et transférées dans une flasque contenant du milieu de culture. . . . .	57
2.19	Flasque de culture 25 cm <sup>2</sup> . . . . .	58
2.20	Schéma du dispositif d'observation des flasques de culture. . . . .	59
2.21	Flasquette de culture. . . . .	60
2.22	Phase exponentielle WTS24- dans RCCM, flasquette. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la DO. . . . .	61
2.23	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> encapsulées. . . . .	61
2.24	Illustration du travail script. . . . .	62
2.25	Schéma longueur optique du chemin optique en différents points de la capsule, vue de haut (gauche) et depuis le côté (droit). . . . .	62
2.26	Courbe de calibration DO en capsule. Le triangle vert correspond à la LOD. . . . .	63
2.27	En bleu, spectre d'absorbance d'une suspension de microalgues. En jaune est représenté le spectre de travail de la caméra Hammamatsu Orca R2 montée sur le microscope, en rouge le spectre de travail du montage DO. . . . .	64
2.28	Timelapse de WTS24- en capsule, dans le RCCM. Le diamètre de cette capsule est de 300 µm. . . . .	65
2.29	Suivi de croissance de la souche WTS24- encapsulées, dans le RCCM. . . . .	65
2.30	Suivi de croissance de la souche WTS24- encapsulées, dans le RCCM. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration. . . . .	66
2.31	Flasque de culture contenant des capsules très concentrées en microalgues. . . . .	67
2.32	Capsules contenant une très forte concentration en micro-algues, au microscope, grossissement 2X. . . . .	67
2.33	Clichés en microscopie optique de coupe au cryostat de capsules contenant des microalgues concentrées au close-packing. On distingue sur les clichés la membrane d'alginate et les microalgues. La coupe fait 30 µm d'épaisseur. . . . .	68
2.34	Formes des microalgues en suspension et en bulk. . . . .	69

CONFIDENTIEL

2.35	Fraction de cellules mortes, en suspension (fraction volumique occupée par les microalgues à 5 millions de cellules/mL : 0,06%) et en capsule au closepacking ((fraction volumique occupée : 67%). . . . .	71
2.36	Lavage infructueux de capsules incubant dans une phase continue contaminée. Une fraction des bactéries restent adsorbées sur les capsules et prolifèrent sans problème. Il est donc impossible de laver les capsules afin d'obtenir une culture sans contamination. . . . .	74
2.37	Décontamination spécifique de la phase continue par l'utilisation de PLL. Les propriétés physico-chimiques de la PLL l'empêchent de pénétrer dans les capsules. La PLL exerce un effet bactériostatique dans la phase continue uniquement. . .	75
2.38	Flasques contenant du RCCM et un inoculum de 10000 <i>E.coli</i> et, de gauche à droite, 10 <sup>-3</sup> %, 10 <sup>-4</sup> % et 0% (contrôle) de PLL P5899; après 1 semaine à l'incubateur. Les bactéries se sont développées dans les flasques contenant 0 et 10 <sup>-4</sup> % de PLL, pas dans celle contenant 10 <sup>-3</sup> % de PLL ni dans celle contenant de l'ampiciline. . . . .	76
2.39	Flasques contenant du RCCM et des <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , et de gauche à droite 10 <sup>-3</sup> %, 10 <sup>-4</sup> % et 0% (contrôle) de PLL. Les microalgues se développent dans les flasques contenant 0 et 10 <sup>-4</sup> %, mais pas dans celle contenant 10 <sup>-3</sup> % de PLL. . . . .	76
2.40	Courbe de croissance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> WTS24- en capsule, dans du RCCM additionné de 10 <sup>-3</sup> % de PLL. . . . .	77
2.41	Courbe de croissance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> WTS24- en capsule, dans du RCCM additionné de 10 <sup>-3</sup> % de PLL. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration. . . . .	77
2.42	Suivi de l'accumulation de lipides par Sta6CW15, en présence (RCCM) et en absence (N0) d'azote. . . . .	80
2.43	Accumulation de lipides dans des corps lipidiques en carence d'azote. Les corps lipidiques ressortent clairement sur le cliché c. Les clichés de la première ligne correspondent à une microalgue qui a subi une carence en azote, les clichés de la deuxième ligne au contrôle. Sur chaque ligne est présenté, dans l'ordre, le canal champs clair, le canal UV (fluorescence du chloroplaste) et le canal TRITC (fluorescence du marqueur lipidique Nile Red). . . . .	81
2.44	Validation du protocole de marquage de lipides avec du Nile Red. Les capsules contiennent de la parol, une huile minérale cosmétique. . . . .	82
2.45	Suivi de l'accumulation de lipides dans les microalgues encapsulées, grâce à un marquage au Nile Red. . . . .	83
2.46	Accumulation de lipides chez des microalgues élicitées en capsule. On distingue bien les corps lipidiques sur le cliché de droite. . . . .	83
2.47	Sédimentation de capsules contenant des microalgues. En moins de trois minutes, la suspension a sédimenté. . . . .	85
2.48	Sédimentation de microalgues. Aucune sédimentation n'est visible. . . . .	86



## CONFIDENTIEL

2.49	Schéma de la culture de deux mutants d' <i>Escherichia coli</i> , I <sup>-</sup> et L <sup>-</sup> , qui sont en mutualisme obligatoire. La population de L <sup>-</sup> , auxotrophe pour la leucine, est physiquement séparée de la population de I <sup>-</sup> ,auxotrophe pour l'isoleucine, par la membrane de la capsule. . . . .	87
2.50	Image (microscope à fluorescence) de la culture deux mutants d' <i>Escherichia coli</i> , I <sup>-</sup> et L <sup>-</sup> , qui sont en mutualisme obligatoire. La population de L <sup>-</sup> , auxotrophe pour la leucine, émet une fluorescence verte; la population de I <sup>-</sup> , auxotrophe pour l'isoleucine, émet elle une fluorescence orange. . . . .	87
2.51	Effet de l'agitation sur les capsules. . . . .	88
2.52	Concept de produit à base de microalgues encapsulées. . . . .	91
3.1	photo-bioréacteur tubulaire avec des « algues des neiges ». À gauche, la première phase de culture (apport de nutriments, éclairage modéré), à droite la phase d'élicitation (privation en nutriments, éclairage intense), qui induit une production de caroténoïdes, d'où la couleur orangée. . . . .	94
3.2	Chimie combinatoire : concept du split-pool. Adapté de Wikipedia. . . . .	96
3.3	Concept du split-pool 1/2 : l'objectif est de voir les effets de 3 milieux de culture différents et de leur séquence, avec deux incubations successives. Une population de capsule est séparée en trois lots, chacun est incubé dans les milieux (B, R et G). Les milieux contiennent un marqueur spécifique, qui s'adsorbent sur les capsules. ces dernières sont ainsi marquées. . . . .	97
3.4	Concept du split-pool 2/2 : les capsules sont ensuite collectées, mélangées et la population est séparée aléatoirement en trois lots. Chacun est incubé dans les milieux (B, R et G). Les milieux contiennent un marqueur spécifique, différents de ceux utilisés à l'étape précédente. Les capsules sont ensuite collectées. Neuf sous-populations sont distinguables, chacune a connue une histoire différente et est marquée de manière univoque. Cela a nécessité seulement deux étapes de marquage et 6 marqueurs différents. . . . .	98
3.5	Cellules souches hématopoïétiques en capsule. Crédit Guillaume Rousseau, 2013-2015. . . . .	100
3.6	Coculture en capsule de kératinocytes (HaCaT) et de fibroblastes (3T3) humains. La couche intermédiaire est constituée de collagène, et héberge les fibroblastes. Les kératinocytes poussent à la surface de la couche intermédiaire et donnent sur le cœur liquide. Les clichés du dessous sont pris au confocal; le cytoplasme est marqué en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les noyaux des cellules mortes en rouge. La plupart des cellules sont donc vivantes. Crédit Anette Funfak 2011-2013.	101
3.7	Culture d'hépatocytes à 2D. Images au microscope optique (première ligne) et au microscope confocal (deuxième ligne); le cytoplasme est marqué en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les noyaux des cellules mortes en rouge. La plupart des cellules sont donc morte au troisième jour. On constate de plus une perte importante de l'activité métabolique (50% de perte de l'activité du cytochrome par jour). Crédit Noushin Dianat 2015-2016. . . . .	102

CONFIDENTIEL

3.8	Culture d'hépatocytes à 3D, en capsule. Images au microscope optique (première ligne) et au microscope confocal (deuxième ligne); le cytoplasme est marqué en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les noyaux des cellules mortes en rouge. La plupart des cellules sont donc vivantes après un mois. Crédit Noushin Dianat 2015-2016. . . . .	103
3.9	Marquage de capsule avec des colloïdes chargés négativement. Le procédé met en œuvre une inversion de la charge des capsules grâce à la PLL. . . . .	107
3.10	Stabilité thermodynamique de l'adsorption électrostatique d'un polymère sur une surface. . . . .	108
3.11	Particules de silice et particules de polymère fonctionnalisées COOH, dans le MCCM et dans du CaCl <sub>2</sub> 100 mM. Les suspensions colloïdales ne s'agrègent pas dans le MCCM. . . . .	109
3.12	Utilisation de PLL pour permettre l'adsorption de particules de silice ou de particules de polymère fonctionnalisées COOH sur des billes d'alginate. Sans la couche de PLL, l'adsorption ne se fait pas. Les particules utilisées font 200 nm de diamètre (Ademtech). . . . .	110
3.13	Particules de silice et particules de polymère fonctionnalisées COOH, dans le MCCM et dans du CaCl <sub>2</sub> 100 mM. Les suspensions colloïdales ne s'agrègent pas dans le MCCM. . . . .	112
3.14	Marquage d'une capsule avec des billes magnétiques de 1 µm de diamètre. . . .	112
3.15	Effet du temps sur la fraction de billes adsorbées sur les capsules. Nous constatons une légère désorption après 12 heures statique (9%), mais qui pourraient très bien être du à la manipulation des capsules. . . . .	113
3.16	Effet des rinçages sur les capsules marquées par des colloïdes (Dynabeads 1 µm de diamètre). Nous ne constatons pas de désorption massive de billes suite aux manipulations (17%). Cependant une forte agitation en désorbe une majorité (plus de 90%). . . . .	114
3.17	Effet d'agitations sur la désorption des capsules. Il n'y a pas de différence significative entre les effets de l'agitateur à rouleaux et l'agitateur orbital. Dans les deux cas, plus de 50% des billes restent adsorbées (respectivement 68 et 53%). Il y a de grandes disparités entre les capsules d'un même lot. . . . .	115
3.18	Spectres d'absorption et d'émission de différents QD. On remarque l'absorption importante dans l'UV et les différents pics d'émissions bien résolus séparément. Crédits Evident Thermoelectrics. . . . .	116
3.19	Évolution de l'intensité de photoluminescence des QD core-type dans le MCCM. Au bout de 7 heures, l'intensité de photoluminescence a diminué de plus de 90%. . . . .	117
3.20	Évolution de l'intensité de photoluminescence des QD QSH-490 et QSH-620. Après 72 heures, la perte d'intensité est respectivement de 28 et 36%, et le rapport signal sur bruit reste excellent (52 et 758). . . . .	117
3.21	Adsorption de QD QSH-490 sur des billes d'alginate. . . . .	118

CONFIDENTIEL

3.22 Évolution de l'intensité de photoluminescence des QD QSH-490 et QSH-620 dans du MCCM additionné de  $10^{-3}\%$  de PLL. Au bout de 72 heures, l'intensité du signal diminue respectivement de 72 et 80 %. . . . . 119

3.23 Particules de silice Micromod 1  $\mu\text{m}$  dans du MCCM et dans du  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Les particules ne s'agrègent pas dans le MCCM. . . . . 120

3.24 Stabilité des particules de silice Micromod dans le MCCM additionné de  $10^{-3}\%$  de PLL. . . . . 120

3.25 Adsorption, sur deux populations de capsules, de deux types de particules de silice contenant chacun un fluorophore différent. Chacun fluorophore est identifiable sans équivoque, le marquage est univoque. . . . . 121

3.26 Deux populations de capsules marquées chacune avec un fluorophore différent sont mélangées. Après 12h, les marqueurs ne se sont pas déplacés sur d'autres capsules. Nous pouvons ainsi mélanger plusieurs capsules portant des marqueurs différents sans que ceux-ci en soient affectés. Cela démontre la validité de l'approche. . . . . 122

3.27 Marquage d'une capsule avec deux fluorophores, successivement. On distingue les deux fluorophores, l'un sur le canal TRITC (Micromod Red), l'autre sur le canal FITC (Micromod Green). . . . . 123

# Liste des tableaux

2.1	Impact de l'autoclavage sur les propriétés rhéologiques de l'alginate. . . . .	38
2.2	Impact du procédé de pasteurisation sur les propriétés rhéologiques de l'alginate. . . . .	40
2.3	Osmolarité des milieux classiques et capsules-compatibles. . . . .	47
2.4	Coefficient de variation des mesures de DO suivant la zone de mesure (centre ou périphérie de la flasque). . . . .	59
2.5	Coefficient de variation des mesures de DO suivant la zone de mesure (centre ou périphérie de la flasquette). . . . .	59
2.6	Évolution de la fraction de cellules mortes avec la concentration en EDTA. . . . .	71
3.1	Ordre de grandeur du nombre de particules nécessaire pour former une monocouche à la surface d'une capsule de 260 µm de diamètre. . . . .	106
A.1	Composition du milieu TAP . . . . .	128
A.2	Composition du milieu Minimum . . . . .	129
A.3	Composition du milieu N0 . . . . .	130
A.4	Composition du milieu RCCM . . . . .	131
A.5	Composition du milieu MCCM . . . . .	132
A.6	Composition du milieu N0CCM . . . . .	133

CONFIDENTIEL

# Introduction

Depuis l'Antiquité, les Hommes utilisent la nature pour produire des molécules qu'ils ne savent pas fabriquer. Cette pratique, qui fait partie des bioprocédés, a été utilisée dans des domaines aussi divers que le textile, l'agroalimentaire ou la médecine. Si prometteuses qu'elles paraissent, ces méthodes de fabrication posent néanmoins des problèmes de complexité, de rendement et de pureté. De fait, dans la majeure partie des cas, des méthodes de production alternatives et synthétiques ont toujours été recherchées et privilégiées par rapport à ces bioprocédés. Récemment, une meilleure compréhension de la biologie, et l'intérêt croissant des sociétés pour les produits « naturels » contribue à un certain renouveau des bioprocédés.

Les micro-algues sont utilisées pour la synthèse de molécules d'intérêt dans plusieurs domaines aussi variés que l'agroalimentaire, la synthèse de colorant, les biofuels ou la cosmétique. Dans ce domaine spécifiquement, les micro-algues sont utilisées pour leurs vertus supposées, et aussi pour l'image qu'elles véhiculent. Capsum est une entreprise issue du LCMD, et fabrique et formule des capsules pour la cosmétique. Capsum est basée à Marseille depuis plus de 6 ans mais garde un lien très fort avec le laboratoire. Cette entreprise a vu une opportunité d'explorer l'utilisation de l'encapsulation de micro-algues pour la cosmétique, et a proposé de financer une thèse CIFRE. L'encapsulation permet de protéger les cellules à l'intérieur d'un véhicule, et de les manipuler plus simplement. Ces travaux de thèse portent sur l'utilisation de l'encapsulation pour cultiver des micro-algues, les éliciter afin de produire des molécules d'intérêts à haute valeur ajoutée, et pour améliorer les conditions d'élicitation. Ils ont été réalisés au sein du LCMD, laboratoire d'étude des matériaux divisés avec un fort intérêt pour l'innovation.

La première partie de ce manuscrit dresse une description générale des bioprocédés et de l'intérêt des micro-algues, en particulier pour la cosmétique. Nous exposons par ailleurs les technologies d'encapsulation dans des véhicules à cœur liquide et à membrane d'alginate, et leur intérêt pressenti pour notre sujet. Puis nous nous penchons sur l'encapsulation de micro-algues, et la caractérisation de la croissance de ces organismes dans les capsules. Cela nécessite l'élaboration d'une méthode de mesure de la concentration en capsule. Nous faisons aussi une preuve de concept de décontamination de culture en capsule sans utiliser d'antibiotiques. Enfin, nous montrons l'intérêt des capsules pour les bioprocédés, en démontrant une production de lipides sous forçage physiologique par des micro-algues encapsulées.

Enfin, nous expliquons dans une dernière partie l'utilité de cribler des séquences de conditions de culture, et les défis que cela pose. Nous établissons une preuve de concept afin de pouvoir réaliser un tel criblage, en tirant pleinement partie de l'utilisation des capsules et de notre savoir-faire de physico-chimiste.

# Chapitre 1

## Les bioprocédés et l'encapsulation dans l'industrie

### Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Les bioprocédés : depuis l'Antiquité jusqu'à demain</b>	<b>17</b>
1.1.1	Définition et historique	17
1.1.2	Les bioprocédés supplantés par la chimie de synthèse	19
1.1.3	Quelles plus-values pour quels défis ?	20
<b>1.2</b>	<b>L'encapsulation pour la cosmétique et au laboratoire</b>	<b>21</b>
1.2.1	Bénéfices de l'encapsulation	21
1.2.2	Méthodes de production de capsules d'alginate au laboratoire	22
<b>1.3</b>	<b>Les microalgues et leur intérêt en cosmétique</b>	<b>27</b>
1.3.1	Généralités sur les microalgues	27
1.3.2	Utilisation en cosmétique et en alimentaire	28
1.3.3	Choix du micro-organisme de travail	30
<b>1.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>35</b>

---

Nous commençons notre exposé par dresser un tableau des bioprocédés et de leur utilisation. Certaines contraintes intrinsèques ont conduit à leur substitution par des procédés de chimie de synthèse ; cependant les bioprocédés ont la capacité de répondre aux défis du futur. L'encapsulation est une thématique en développement, et qui peut apporter une contribution intéressante aux bioprocédés. Dans le cadre de travail financé par un acteur de la cosmétique, nous nous sommes intéressés aux micro-algues et à leur utilisation dans le cadre d'un bioprocédé mettant en jeu une encapsulation.

## 1.1 Les bioprocédés : depuis l'Antiquité jusqu'à demain

### 1.1.1 Définition et historique

#### Définition

Commençons par définir ce qu'est un bioprocédé. Ce terme désigne toutes les mises en œuvre de systèmes vivants, ou de leurs constituants, pour la production de savoir, biens ou services [1].

Les bioprocédés couvrent des domaines très larges, allant de l'alimentaire à la pharmacie en passant par l'agriculture et l'extraction de métaux. Les Hommes les utilisent depuis au moins l'Antiquité, et leur usage s'intensifie et s'élargit à mesure que les connaissances et les techniques s'améliorent.

Pour comprendre quelle place les bioprocédés auront demain, il est important de comprendre leur passé et les dynamiques profondes qui les font évoluer. Dans la mesure où nous ne nous intéressons qu'aux molécules à forte valeur ajoutée, nous excluons l'agriculture de notre exposé.

#### Les bioprocédés : une utilisation plurimillénaire

Le premier exemple qui nous vient à l'esprit est la fabrication de boissons alcoolisées fermentées. La fermentation est la conversion par des micro-organismes de sucres en éthanol. Les premières preuves formelles de son existence remontent à - 4000 au Moyen-Orient. En France, les premières traces de consommation de bière remontent à -500 [2]. Les Celtes lui préfèrent la cervoise (non houblonnée) et les Gréco-Romains le vin ; et au VIII<sup>e</sup> siècle Charlemagne accorde aux moines brasseurs le privilège de fabriquer la bière, mais ne délaisse pas pour autant la viticulture. Il possédait en effet des vignes en Bourgogne, où un grand cru porte toujours son nom : le Corton-Charlemagne.

Si le procédé de fermentation basé sur des levures est maîtrisé au Moyen-Âge, les développements restent à cette époque nécessairement très empiriques.

Nous pouvons aussi penser aux produits laitiers. Le lait fermenté est fabriqué grâce à des bactéries des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium*. La fabrication du fromage est un bel exemple de bioprocédé, et implique de multiples micro-organismes (bactéries, moisissures et levures). Ces derniers jouent un rôle essentiel dans l'affinage du fromage, et la formation des caractéristiques sensorielles des fromages.



## CONFIDENTIEL

Nous terminerons ces exemples en nous intéressant à l'industrie textile. La soie est issu de la chenille du *Bombyx mori*. Celle-ci sécrète une bave qui durcit en formant un fil de soie brute dont la longueur varie entre 800 et 1500 mètres. L'industrie textile utilise des pigments pour colorer les vêtements. Certains sont d'origine minérale, tel que l'ocre. D'autre sont d'origine végétale (garance) ou encore animale, tel que le carmin. Ce colorant est extrait d'une cochenille, *Dactylopius coccus*, et a d'autres applications en biologie (coloration de la cellulose grâce au carmin aluné) et en alimentaire (colorant E120).

Du fait du manque de connaissance et du peu de développement des techniques, ces premières approches étaient très empiriques. Elles permettaient de répondre à des besoins fondamentaux, à savoir d'une part la transformation des ressources végétales et animales en aliments et boissons, et de l'autre d'assurer la conservation efficace des aliments (fermentation typiquement) ; sans oublier d'améliorer leurs propriétés organoleptiques.

Le XIX<sup>e</sup> siècle a marqué un tournant dans le développement des bioprocédés, principalement grâce à l'introduction de la démarche scientifique.

### La démarche scientifique au service des bioprocédés

Le XIX<sup>e</sup> siècle voit l'introduction de la démarche scientifique et le développement d'outils tels que le microscope, ce qui aboutit à la création de la microbiologie (travaux de Louis Pasteur et Robert Koch).

Ainsi, les micro-organismes qui sont à la base de nombres de bioprocédés sont de mieux en mieux compris et utilisés. L'alimentaire bénéficie largement de ces avancées, par exemple grâce à l'identification et la compréhension des levures par Hansen et Pasteur ; et la mise au point de la pasteurisation par ce dernier.

Les épidémies de ce siècle provoquent le développement de bioprocédés destinées à les contrer, tel que l'élaboration du sérum antipesteux de Yersin (sérum de cheval), ainsi que les autres travaux orientés contre la peste bovine.

Le siècle suivant voit le développement de la production industrielle d'antibiotiques, comme la pénicilline. Cette molécule découverte en 1929 par Fleming est produite dès 1941 aux États-Unis grâce à un champignon, *Penicillium chrysogenum*.

D'autres biomolécules d'intérêt sont le sujet de développement de bioprocédés, telles que les acides aminés et les enzymes (détergence et dégradation de l'amidon notamment).

Suite à ce premier essor, le développement des bioprocédés s'accélérent encore au milieu des années 1970.

### Récents développements

Les années 1970 voient le l'avènement de techniques de biologie moléculaire et l'approfondissement de connaissances en biochimie. Ceci ouvre la voie au génie génétique.

L'hybridation entre des cellules lymphoïdes normales de mammifères et des cellules myélo-mateuses de tumeurs malignes du système immunitaire donne naissance à des cellules nommées

## CONFIDENTIEL

hybridomes. Celles-ci cumulent deux qualités recherchées, à savoir la production d'anticorps monoclonaux et une lignée cellulaire immortalisée.

Le succès de Genentech démontre l'activité intense autour de ces nouveaux bioprocédés. Genentech s'appuie sur des transgénèse, c'est-à-dire l'implantation de gènes dans un organisme vivant, en l'occurrence des bactéries. Ces bactéries modifiées synthétisent ainsi des molécules d'intérêt pharmaceutique (insuline, hormones de croissance, anticorps). Les levures sont aussi utilisées (vaccin contre l'hépatite B).

Plus récemment, les cellules de Mammifères ont remplacé les micro-organismes pour la production d'anticorps (Herceptine par exemple).

L'agriculture bénéficie aussi de ces transgénèses, notamment grâce à l'invention des organismes génétiquement modifiés Bt. Ces plantes incorporent des gènes de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, qui leur confère une résistance accrue aux insectes.

Enfin, la découverte de la pénicilline a entraîné une exploration de la diversité du vivant à la recherche de molécules d'intérêt. Les antibiotiques sont un bon exemple, puisqu'ils sont en grande partie issus de micro-organismes. Nous pouvons aussi penser aux taxanes extraits de l'écorce d'if, et utilisés comme agents chimiothérapeutiques (paclitaxel, plus connu sous le nom commercial de Taxol, et docétaxel ou Taxotère). La diversité des micro-organismes est encore en cours d'exploration, et donne toujours lieu à des découvertes de molécule d'intérêt [3]. Cette approche est différente de celle du génie génétique. Trouver un organisme qui sécrète une molécule d'intérêt nécessite d'en cribler un grand nombre, ce qui requiert des outils complexes.

Malgré leurs apports et la diversité des molécules auxquels ils donnent accès, les bioprocédés ne sont pas pour autant utilisés aussi largement que ce qu'on pourrait le croire. Pour une grande partie de ces molécules, l'industrie a en effet préféré se tourner vers la chimie de synthèse.

### 1.1.2 Les bioprocédés supplantés par la chimie de synthèse

La mise en œuvre de bioprocédés présente certains inconvénients, qui ont conduit au développement d'alternatives.

#### Les limites des bioprocédés

Tout d'abord, certains bioprocédés sont assez compliqués à mettre en œuvre. Un bon exemple est celui de la sériciculture, qui nécessite une attention quasi-constante et une adaptation des conditions au fur et à mesure que les chenilles évoluent.

L'industrialisation des bioprocédés pose un réel défi. Un exemple très parlant est celui de l'acétate de linalyle, à savoir l'arôme de lavande. Givaudan, premier fournisseur mondial d'arômes et parfums, argumente que si l'on voulait produire cette molécule de manière naturelle, recouvrir la Terre de champs de lavande de suffirait pas à assurer la production pour satisfaire les besoins de Soupline uniquement. Cette limite entraîne d'une part un coût important, et de l'autre une limitation des quantités de molécules disponibles.

La purification de la molécule d'intérêt est une partie critique du procédé. Elle peut s'avérer limitante, que ce soit en terme d'implémentation ou simplement en terme d'élaboration. Il fallut

ainsi 11 ans pour trouver le moyen de purifier la péniciline [4].

Enfin, les contaminations peuvent être un problème, *a fortiori* quand un bioprocédé est utilisé en alimentaire. Le développement d'un micro-organisme non désiré peut en effet altérer les propriétés organoleptiques de l'aliment. Pire, ledit micro-organisme peut s'avérer pathogène et poser un problème pour les consommateurs.

Ces contraintes ont entraîné le développement d'alternatives pour se procurer ces molécules.

## Les avantages de la chimie de synthèse

La chimie de synthèse a permis de s'affranchir de ces contraintes.

Un procédé de synthèse est en effet plus avantageux en terme de rendement, de coût, de purification, de fiabilité et de faisabilité industrielle. Un bon exemple est celui de l'acétate de linalyle. Celui de synthèse est moins allergène que celui d'origine naturelle, et sa synthèse ne nécessite de fait pas la surface d'une planète entière.

L'étape difficile de cette approche est de trouver la voie de synthèse. De fait, la chimie de synthèse a très bien résolu ce problème. La viscose remplace la soie naturelle depuis le début du XX<sup>e</sup> le Ponceau 4R est une alternative au rouge cochenille, et John Sheehan réalise la synthèse totale de la pénicilline en 1957.

Au vu de ces limites, on serait amené à douter du bienfondé de développer les bioprocédés. Pourtant, ils apportent de réels avantages qui leur permettent de proposer des solutions à des problématiques actuelles et à venir.

### 1.1.3 Quelles plus-values pour quels défis ?

Les bioprocédés permettent l'accès à des produits trop complexes pour être synthétisés.

Givaudan fournit l'exemple de la fève Tonka, donc il extrait un arôme nommé absolu de fève Tonka. La molécule responsable de cette odeur, la coumarine, a été identifiée et synthétisée. Cependant elle reste moins complexe et facettée que l'absolu, qui reste utilisée dans les parfums de luxe. La coumarine est réservée aux parfums moyen/bas de gamme.

De même, le secteur du luxe préfère utiliser une soie d'origine naturelle, qui possède de meilleures propriétés (résistance, résilience entre autres) que la viscose.

Les bioprocédés s'orientent vers une recherche d'organismes qui produisent nativement une molécule d'intérêt. Cet engouement est motivé par la réalisation de la grande diversité des micro-organismes présents dans les écosystèmes, et donc la grande diversité des molécules qu'ils secrètent (Biotechnet Switzerland<sup>1</sup>).

Les bioprocédés cherchent à utiliser au mieux la diversité des micro-organismes, entraînant ainsi le développement de méthodes de criblage de cellules, afin de récupérer les êtres les plus intéressants. Les méthodes de criblage de conditions de culture sont toujours présentes, et

---

1. [http://biotechnet.ch/sites/biotechnet.ch/files/aktuell/dateien/2015-07-04\\_chimia.pdf](http://biotechnet.ch/sites/biotechnet.ch/files/aktuell/dateien/2015-07-04_chimia.pdf)

## CONFIDENTIEL

une meilleure compréhension de la biologie des êtres vivants permet d'envisager des procédés plus complexes. Ainsi, l'élicitation, à savoir la production d'une molécule d'intérêt grâce à une contrainte physiologique, se développe [5].

Le secteur de la santé pousse vers la découverte et la production d'actifs issus de micro-organismes [6], et soutient aussi fortement le développement de culture de cellules fragiles mais très intéressantes, comme les cellules souches. Nous pouvons citer la création récente d'EryPharm, une startup qui vise à commercialiser des hématies produites *in vitro*.

Les bioprocédés de production d'anticorps à base de cellules de mammifères s'avèrent très coûteux, et des alternatives sont en cours d'exploration. Un projet tel que Pharma-Planta vise à produire des molécules d'intérêt pharmaceutique par des plantes (tabac ou maïs par exemple). Une molécule est actuellement en phase 1 de test clinique.

Le secteur de l'énergie est une importante source d'activité pour les bioprocédés, notamment via les biocarburants et la production d'hydrogène [6] ; et grâce à d'importants acteurs comme Airbus ou Solazyme pour ne citer qu'eux.

Enfin, les bioprocédés permettent de répondre à un enjeu de société. Cette dernière est en effet de plus en plus demandeuse de produits issus de techniques de fabrication naturelles, plutôt que de voies de synthèse chimique. L'essor de la cosmétique « naturelle » et de l'agriculture biologique en sont des bons indices.

Sous cette impulsion, le secteur de l'alimentation renouvelle son intérêt grâce à l'émergence de la nutraceutique, c'est à dire les aliments ayant des effets positifs sur la santé. Certains micro-organismes présentent des qualités nutritionnelles qui justifient cet intérêt.

Comme nous l'avons souligné, la nouvelle impulsion des bioprocédés s'appuie en partie sur des innovations technologiques. Nous pensons que l'encapsulation peut apporter des avantages aux bioprocédés, comme elle l'a fait en cosmétique.

## 1.2 L'encapsulation pour la cosmétique et au laboratoire

### 1.2.1 Bénéfices de l'encapsulation

L'encapsulation se développe en cosmétique, notamment grâce aux récentes avancées technologiques, en micro/millifluidique et en matériau. C'est une tendance très porteuse, comme le montre la forte croissance du nombre de produits à base de capsules sur le marché.

#### Contribution marketing et sensorielle

L'encapsulation permet aussi de pousser un discours marketing autour de la protection des actifs et de la délivrance contrôlée, discours nécessairement vendeur indépendamment de l'apport supposé ou réel du système d'encapsulation.

Cet effet est décuplé lorsque les capsules sont visibles à l'œil nu, comme c'est le cas avec les perles vendues par Capsum. À ce discours s'ajoute le visuel tout à fait innovant de ces produits, qui a fortement contribué à leur succès.

L'encapsulation donne enfin accès à des textures et des sensations nouvelles, liées à la structure du produit ou encore à la délivrance du contenu des capsules. C'est le cas par exemple par le Sérum Hydra Beauty de Chanel, développé et fabriqué par Capsum. Les connaisseurs apprécieront le toucher silicone sans qu'il y ait d'huile silicone dans le produit.

Cet essor de l'encapsulation est lié en partie aux développements de méthodes de micro et milli fabrication, ainsi qu'à l'approfondissement des connaissances. Le laboratoire possède un certain savoir-faire dans ce domaine.

### **1.2.2 Méthodes de production de capsules d'alginate au laboratoire**

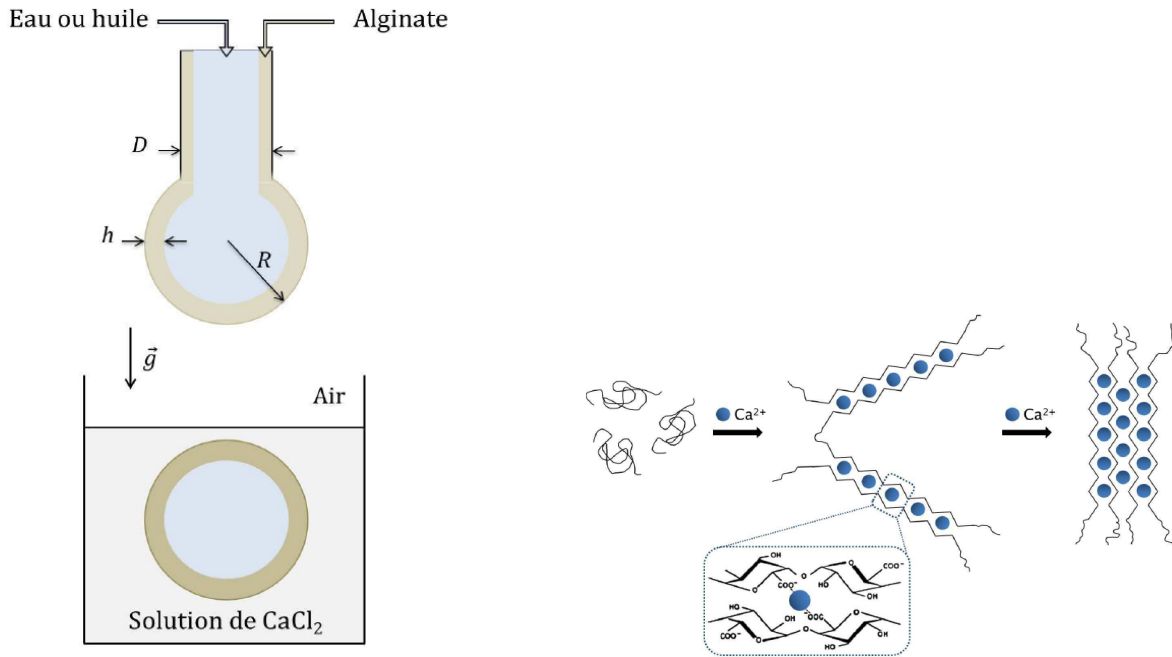
Nous allons maintenant exposer une des technologies d'encapsulation développées au laboratoire. Nous sommes capables de produire des capsules de taille submillimétrique constituées d'une coque en alginate et d'un cœur aqueux. Ces développements ont été rendus possibles grâce, entre autres, à deux travaux de thèse.

#### **Encapsulation dans des véhicules d'alginate de taille millimétrique**

Les premiers développements technologiques au laboratoire autour de l'alginate ont été fait par Leslie Rolland. L'objectif de sa thèse [7], financée par Capsum, était de concevoir des capsules d'hydrogel contenant un cœur liquide ou huileux, et d'en comprendre les propriétés physico-chimiques, pour une application en cosmétique.

Ces travaux ont abouti à l'élaboration d'un procédé de fabrication de capsules de taille millimétrique constituées d'une membrane en alginate, et d'un cœur liquide aqueux ou huileux. La membrane de ces capsules est semi-perméable, et la taille des pores est estimée à 20 nm [8]. Le procédé est compatible avec les normes alimentaires, cosmétiques, et il permet aussi la culture de cellules.

Essentiellement, un injecteur permet de faire s'écouler de manière coaxiale une phase externe constitué d'alginate de sodium, et une phase interne, aqueuse ou huileuse. Les débits de l'écoulement sont ajustés afin d'être en régime goutte-à-goutte (dripping). Les gouttes, constituées d'une enveloppe d'alginate liquide autour du cœur tombent dans un bain de calcium, ce qui entraîne la gélification de l'alginate et ainsi la création d'une capsule constituée d'une coque gélifiée comprenant un cœur liquide, comme illustré en figure 1.1. Les capsules peuvent ensuite être récupérées.



(a) Schéma du procédé de fabrication de capsules de taille millimétrique. Une bi-goutte est formée par co-extrusion de la solution de cœur (eau ou huile) et la solution d'alginate. Au contact du bain de calcium, l'alginate gélifie instantanément pour former une capsule à cœur liquide et membrane fine d'hydrogel.

(b) Gélification de l'alginate par des ions calcium, qui permet de former un gel dur.

FIGURE 1.1 – Procédé de fabrication de capsules d'alginate à cœur liquide et à fine membrane. Crédit Leslie Rolland.

Ce procédé est tout à fait industrialisable, comme l'a montré Capsum en commercialisant plusieurs produits cosmétiques basés sur des capsules. Certains sont montrés en figure 1.2.



(a) Cure Jeunesse Abeille Royale de Guerlain (2013)



(b) Pearl Activ® Serum Perlé de Plante System (2013)



(c) Transforming Pearl Serum - Do Not Age de Dr Brandt (2013)

FIGURE 1.2 – Quelques exemples de produits cosmétiques à base de capsules, fabriqués par Capsum.

De telles capsules ont été utilisées pour la cosmétique, mais aussi pour la culture de micro-organismes. Nous soulignons que ces capsules comportent une partie creuse délimité par une fine membrane d'hydrogel. Ceci leur confère une supériorité sur les billes d'hydrogel, pleines. De telles billes ont déjà utilisées en médecine régénérative [9], ou encore pour immobiliser des micro-algues [10] [11] [12]. Cependant, elles ne permettent pas de recréer les conditions dans lesquelles ces organismes poussent naturellement. En effet, les micro-algues se sont alors plus libre de nager dans un milieu liquide. Ceci peut avoir a un effet délétère [13]. Les observations sont cependant très dépendant de l'espèce immobilisée [12]. L'utilisation de capsules permet notamment de palier à cela.

La culture de cellules en capsule impose d'avoir une diffusion optimale des nutriments présents dans la phase continue jusqu'au centre des capsules. Ainsi, il est préférable de travailler avec des capsules faisant quelques centaines de microns plutôt que quelques millimètres.

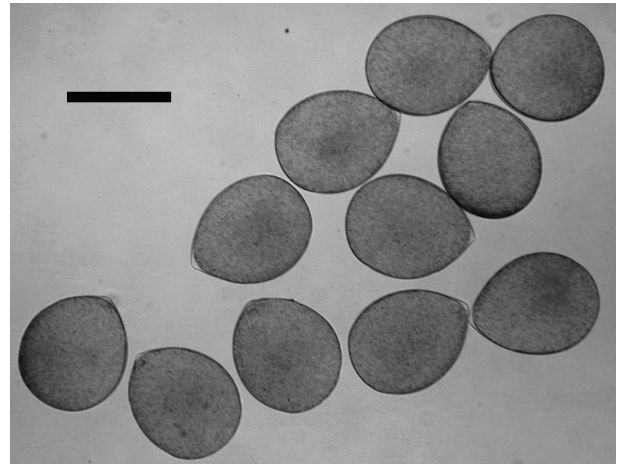
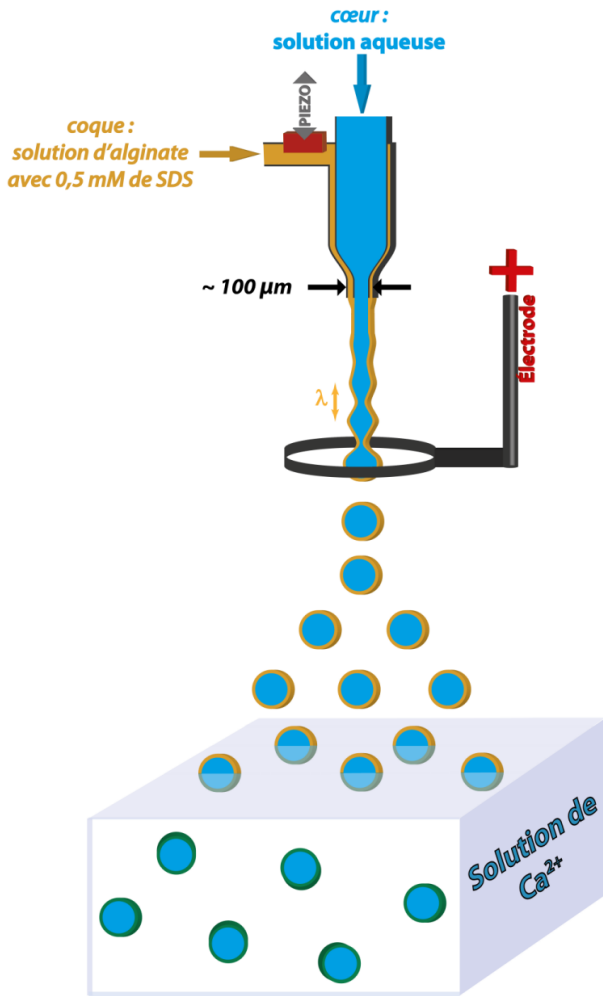
## Encapsulation dans des véhicules d'alginate de taille submillimétrique

Hugo Doméjean a pris la suite des développements technologiques. L'objectif de sa thèse [14] était de miniaturiser le procédé de fabrication de capsules à cœur aqueux. La maîtrise de l'instabilité de Rayleigh-Plateau et la compréhension des contraintes physico-chimiques et rhéologiques ont permis de mettre au point un procédé de fabrication de capsules de taille submillimétrique.

Un injecteur est fabriqué en assemblant un support stéréolithographié et un capillaire de verre. Ledit capillaire de verre a été préalablement étiré et poncé pour réduire son diamètre interne de 1 mm à 100-150  $\mu\text{m}$ . Puis, une pièce comportant une membrane est vissée sur la partie supérieure de l'injecteur. Cette membrane peut être mise en mouvement grâce à un dispositif piézo-électrique, et transmet ainsi une excitation au fluide contenu dans l'injecteur. Cela permet de contrôler l'instabilité de Rayleigh-Plateau, ainsi la fragmentation du jet donne naissance à une population de gouttes monodisperses et non polydisperse. Pour éviter la coalescence des gouttes en vol, le jet passe à travers une électrode. Les gouttes ainsi chargées ne se rencontrent pas et tombent dans le bain de calcium pour donner une population de capsules monodisperse. Cela est illustré en figure 1.3. Ce procédé est relativement facile à mettre en œuvre, et il est biocompatible. Il permet de faire des capsules de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre constituées d'une membrane d'alginate de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et d'un cœur aqueux. Ce procédé est en cours d'industrialisation chez Capsum.

Ces avancées ont permis de travailler sur des projets d'encapsulation appliqués à la biologie. Plusieurs types cellulaires ont été cultivés dans de telles capsules au laboratoire : cellules cancéreuses humaines, hépatocytes primaires humains, cellules souches hématopoïétiques, bactéries. Une preuve de concept a été réalisée avec succès avec des microalgues. Ces micro-organismes présentent un fort intérêt industriel, en particulier pour la cosmétique.





(a) Schéma du procédé de fabrication de capsules de taille submillimétrique. Un jet structuré est formé par co-extrusion de la solution de cœur (eau ou huile) et la solution d'alginate. La déstabilisation du jet est contrôlée par un dispositif piézo-électrique, ce qui conduit à la formation d'une population monodisperse de gouttes submillimétriques. L'induction de répulsions électrostatique grâce à une électrode empêche la coalescence en vol. Au contact du bain de calcium, l'alginate gélifie instantanément pour former une population monodisperse de capsules à cœur liquide et membrane fine d'hydrogel. Crédit Hugo Doméjean

(b) Capsules monodisperses, barre d'échelle 500 µm. Crédit Hugo Doméjean

FIGURE 1.3 – Fabrication de capsules d'alginate à cœur liquide et à fine membrane, monodisperses et de taille submillimétrique. Crédit Hugo Doméjean.

## 1.3 Les microalgues et leur intérêt en cosmétique

### 1.3.1 Généralités sur les microalgues

Les microalgues constituent un groupe polyphylétique très diversifié (au moins 200 000 espèces différentes) qui regroupe des eucaryotes unicellulaires (microalgues vertes, rouges et brunes) et des procaryotes photosynthétiques (microalgues bleues ou cyanobactéries). Ces organismes peuvent être trouvés dans les eaux douces, ou marines. Si une large partie vit indépendamment, des symbioses existent. Celles-ci peuvent mettre en jeu des être aussi variés que des champignons (lichens), des cnidaires (coraux [15] [16] et méduses [17]), du zooplancton (radiolaires [18]), des mollusques (limaces de mer, bénitiers [15]), des éponges [15] ou encore de manière plus anecdotique en symbiose avec un mammifère terrestre [19]).

La phylogénétique des microalgues est résumée de manière simplifiée en figure 1.4. Apparues il y a 3,8 milliards d'années, les cyanobactéries seraient les premiers organismes à avoir réalisé la photosynthèse. Les algues rouges et vertes appartiendraient à une même famille (Plantae) et seraient apparues il y a deux milliards d'années.

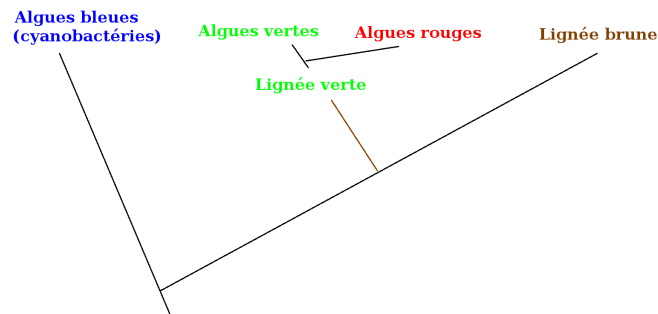


FIGURE 1.4 – Phylogénétique simplifiée des microalgues.

Toutes les microalgues sont capables de réaliser la photosynthèse, et sont donc (photo)autotrophes. Plusieurs espèces de microalgues sont capable de passer de ce mode de croissance à une croissance hétérotrophe, à savoir en métabolisant un substrat carboné (glucose, acétate, glycérol, etc.) comme source de carbone et d'énergie.

La diversité des microalgues, et donc des molécules qu'elles secrètent, en fait une cible de choix pour des applications industrielles [20] [21] [22][21]. Quelques espèces sont connues et utilisées depuis des siècles, comme la cyanobactérie du genre *Arthrospira*, plus connue sous le nom de spiruline.

Certaines espèces de microalgues ont la particularité de s'accomoder de conditions très hostiles, comme *Dunaliella salina* qui pousse en milieu hyper salin, ou encore les espèces du genre *Arthrospira* qui poussent en milieu hyper alcalin (pH 10).

Si les transgènes chez les microalgues sont moins développées que chez les bactéries, celles-ci sont néanmoins possibles et en développement [23].

### 1.3.2 Utilisation en cosmétique et en alimentaire

#### Biomasse alimentaire

Les microalgues sont consommées depuis aussi longtemps que le XIII<sup>ème</sup> siècle, par les Aztèques<sup>2</sup>. Ces derniers récoltaient la spiruline du Lac Texcoco, la faisait sécher et l'utilisaient ensuite comme aliment, sous le nom de « tecuitlatl ». De même, les tribus habitant au bord du lac Tchad récoltent toujours la spiruline, et la font sécher pour en faire un gâteau nommé « dihé », comme illustré en figure 1.5. La consommation de spiruline est ainsi de 50 g par personne et par semaine. Ces habitudes ont été rapportées en 1940 par le phycologiste français Pierre Jean Louis Dangeard, puis en 1965 par le botaniste belge Jean Léonard, membre d'une expédition trans-Saharienne.



FIGURE 1.5 – La récolte et le séchage de la Spiruline au bord du Lac Tchad, rapport de la FAO « The Future is an Ancient Lake », 2004.

Dans le même temps, une entreprise mexicaine demanda à l'Institut Français du Pétrole d'investiguer les efflorescences algales dans ses bassins d'évaporation de bicarbonate de sodium. C'est ainsi que la première étude systématique détaillée des conditions de culture et de la physiologie de la spiruline fut réalisée. Cette étude a posé les bases de la production industrielle de spiruline.

La Spiruline a depuis longtemps été identifiée comme une solution future pour l'alimentaire, notamment grâce à ces qualités nutritionnelles (World Health Organization, 1974 ; et plusieurs rapports de la FAO, ainsi que le Livre Turquoise [24]). Un programme de l'ONU promeut l'utilisation de cette microalgue pour lutter contre la malnutrition. Les agences spatiales européennes et américaines ont proposé au début des années 1990 de cultiver cette microalgue au cours de mission long terme dans l'espace.

Outre son contenu nutritionnel, sa production entraîne un impact environnemental bien moindre que d'autres aliments. À rendement protéique identique, la culture de la spiruline consomme 30 fois moins de surface et 3 fois moins d'eau que la culture du soja.

2. Diaz Del Castillo (soldat de Cortés), The Discovery and Conquest of Mexico

Outre cet intérêt pour l'alimentaire, les microalgues expriment des molécules qui ont un intérêt pour la cosmétique.

### Molécules d'intérêts

Les microalgues, grâce à leur diversité, expriment un large éventail de molécules d'intérêt [24] [22]. Une liste non exhaustive recense notamment le beta-carotène, l'asthaxanthine, les acides gras polyinsaturés (PUFA), la phycoérythrine, des vitamines, des lipides et des protéines (dont certaines d'intérêt pharmaceutique), voir figure 1.6.

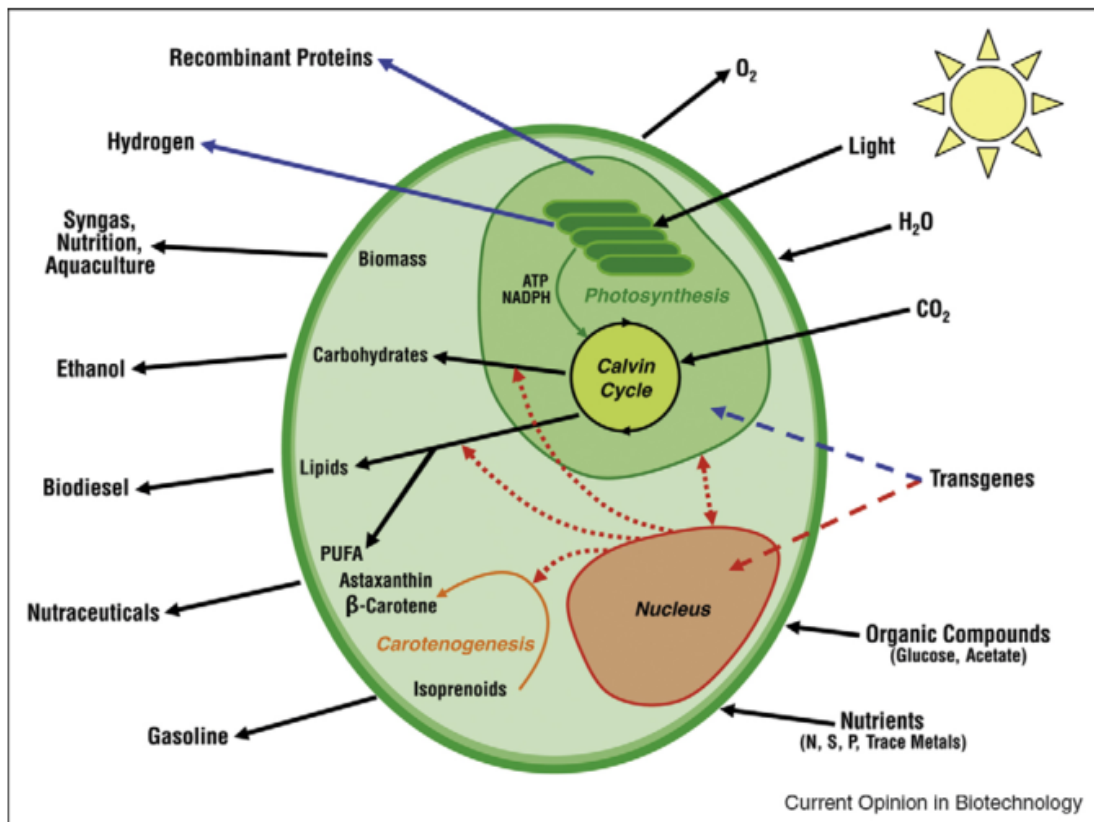


FIGURE 1.6 – Une vision des molécules d'intérêt sécrétées par les microalgues. Crédit Rosenberg et al., Current Opinion in Biotechnology, 2008.

Les microalgues sont connues pour synthétiser une grande variété de lipides [25]. Ceux-ci occupent une place de choix parmi les molécules d'intérêt pour la cosmétique, le squalène en est un bon exemple [26].

Les microalgues sont capables d'accumuler du sélénium [24] [27]. Or cet élément est prisé en cosmétique pour ses vertus antioxydantes. De même, des composés phénoliques antioxydants peuvent être produits par des microalgues après exposition à des UV [28]. L'utilisation d'UV pour induire la production d'une molécule d'intérêt chez une microalgue est du reste utilisée par Mibelle Biochemistry, qui commercialise un actif nommé « Snow Algae Powder ».

## CONFIDENTIEL

Les microalgues sont aussi connues pour sécréter des molécules qui blanchissent la peau, des molécules aux propriétés antimicrobiennes, hydratantes ou texturantes, ou encore des pigments comme les caroténoïdes [29].

### **Pertinence des microalgues pour la cosmétique**

Les termes « microalgue », « actif bio-sourcé » sont très porteurs en cosmétique en ce moment. Il est facile de s'en convaincre en lisant la presse spécialisée<sup>3</sup>. Mibelle Biochemistry a commercialisé en 2014 un actif anti-âge extrait de microalgues sous le nom "Snow Algae Powder", qui a remporté le BSB Innovation Prize 2014. Des entreprises comme Fermentalg ou Solazyme se basent exclusivement sur les microalgues pour fournir des extraits à destination des secteurs cosmétiques et alimentaire, entre autres. D'autres entreprises comme Setalg produisent et vendent des microalgues, ou les incorporent dans leurs produits.

Certaines marques cosmétiques se positionnent partiellement ou totalement sur le segment de la cosmétique algale. Nous pouvons citer par exemple Daniel Jouvence, une marque du groupe Yves Rocher, fondateur de la cosmétique végétale. Le slogan de Daniel Jouvence, « l'océan est source de beauté », ne laisse planer aucun doute sur le positionnement de la marque. Cette image est renforcée par la douzaine de microalgues présente dans sa « microalgorithme ». Nous pouvons aussi citer à Thalgo, dont l'image repose sur « la beauté marine », et en pratique des macro- et microalgues.

Maintenant que nous sommes convaincus de l'intérêt des microalgues pour la cosmétique, il nous reste à choisir un micro-organisme avec lequel travailler.

### **1.3.3 Choix du micro-organisme de travail**

#### **Contraintes sur le choix**

Il était nécessaire de sélectionner un micro-organisme. Nous ne souhaitons pas injecter des ressources dans la recherche et l'optimisation de conditions de culture favorables. De plus, le laboratoire possède un savoir-faire relativement limité en biologie, aussi nous fallait-il une espèce simple à cultiver. Comme nous nous intéressons à des bioprocédés, la souche, ou un de ses mutants connus, doit synthétiser une molécule d'intérêt pour la cosmétique et/ou l'alimentaire. Enfin, il doit être compatible avec la réglementation cosmétique et/ou l'alimentaire en Europe et aux États-Unis ; et présenter un intérêt dans ces domaines.

La sélection du micro-organisme répond aux contraintes suivantes :

- être facile à cultiver et bien connu
- produire une molécule d'intérêt
- être utilisable et intéressant en cosmétique et/ou en alimentaire

Le laboratoire est en collaboration avec l'UMR 7141<sup>4</sup>, Physiologie Membranaire et Moléculaire du Chloroplaste, hébergée à l'Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC). Cette UMR

---

3. Claire Dhouailly, Elle, « L'algue, le nouvel eldorado de la cosméto »

4. <http://www.ibpc.fr/UMR7141/>

## CONFIDENTIEL

travaille beaucoup avec *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette dernière est une microalgue modèle, sa biologie et ses conditions de culture sont donc bien connues. Il est très simple de trouver des cultures axéniques, à savoir sans autre être vivant que *Chlamydomonas reinhardtii*. Or il est bien plus simple de travailler avec une culture axénique.

D'autre part, un mutant de *Chlamydomonas reinhardtii*, Sta6CW15, est connu pour accumuler des lipides lorsqu'elle est carencée en azote.

Cette collaboration avec l'IBPC a été fructueuse par le passé [30], aussi était-il pertinent de continuer la collaboration. Comme *Chlamydomonas reinhardtii* répondait aux contraintes que nous avons identifiées, nous avons choisi de travailler avec.

### Une brève description de *Chlamydomonas reinhardtii*

Cette partie ne se veut pas une description extensive de *Chlamydomonas reinhardtii*, qu'on peut trouver dans le Chlamydomonas Sourcebook [31].

### Morphologie

*Chlamydomonas reinhardtii* est une espèce d'algue verte d'eau douce, isolée en 1945 dans le Massachusetts et utilisée depuis les années 60 comme modèle d'organisme eucaryote unicellulaire photosynthétique. Elle possède deux flagelles et un imposant chloroplaste. Sa structure cellulaire est présentée en figure 1.7. Cette microalgue peut être facilement cultivée, soit en autotrophie (métabolisme photosynthétique en présence de lumière) soit en hétérotrophie (catabolisation d'un substrat organique). Elle a servi d'outil d'investigation pour des recherches fondamentales sur la mobilité des cellules planctoniques, la phototaxie et la reconnaissance cellulaire, ainsi que des études sur les flagelles et sur la réaction à des changements de conditions de culture. De nombreux mutants ont été créés à ces occasions. Le génome complet a été publié en 2007 [32]. La conservation des souches est assurée par le Chlamydomonas Resource Center<sup>5</sup>, hébergé à l'Université du Minnesota.

---

5. <http://www.chlamycollection.org/>

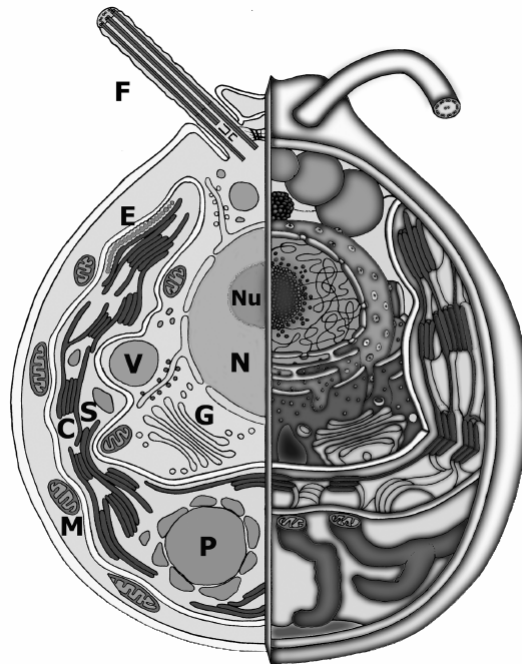


FIGURE 1.7 – Structure cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii*, représentant le noyau central (N) avec le nucléole (Nu), les deux flagelles isoformes (F), le chloroplaste (C) avec les stigma (E), le pyrénoïde contenant de l'amidon (P) et les mitochondries (M). De plus, il est possible de distinguer la vésicule du Golgi (G), des grains d'amidon (S) et des vacuoles (V). Extrait de Nickelsen and Kück (2000).

## Reproduction

*Chlamydomonas reinhardtii* connaît deux modes de reproduction, sexuée et asexuée. Le premier met en jeu un individu de type + et un individu de type -, qui fusionnent pour créer un zygote non flagellé. Celui-ci subit une méiose qui conduit à la création de 4 cellules filles flagellées, ce qui termine le cycle cellulaire. Le deuxième mode de reproduction met en jeu un unique individu, qui subit une mitose et conduit à la création de deux cellules filles flagellées. Dans des conditions de culture idéales, les cellules peuvent parfois subir deux à trois mitoses successives avant de briser la paroi végétale et d'être libérée dans le milieu. Ainsi, une seule étape de croissance peut amener à la création de 4, voire 8 cellules filles. Cela est illustré en figure 1.8. De telles images ont pu être prises au laboratoire en adaptant une technique mise au point par [33]. Essentiellement, les cellules sont confinées entre une lamelle et un pavé d'agar. Cela les force à croître à deux dimensions.

Les facteurs qui contrôlent la reproduction sont assez bien connus [34]. La lumière joue un rôle dans cette régulation, aussi est-il habituel en laboratoire d'exposer les cultures d'algues à un cycle jour/nuit (12h/12h ou légèrement différent).

*Chlamydomonas reinhardtii* a déjà été utilisé pour des bioprocédés. Cette microalgue a donné lieu à plusieurs projets de vaccins, contre la malaria [35], les Staphylocoques dorés [36],

## CONFIDENTIEL

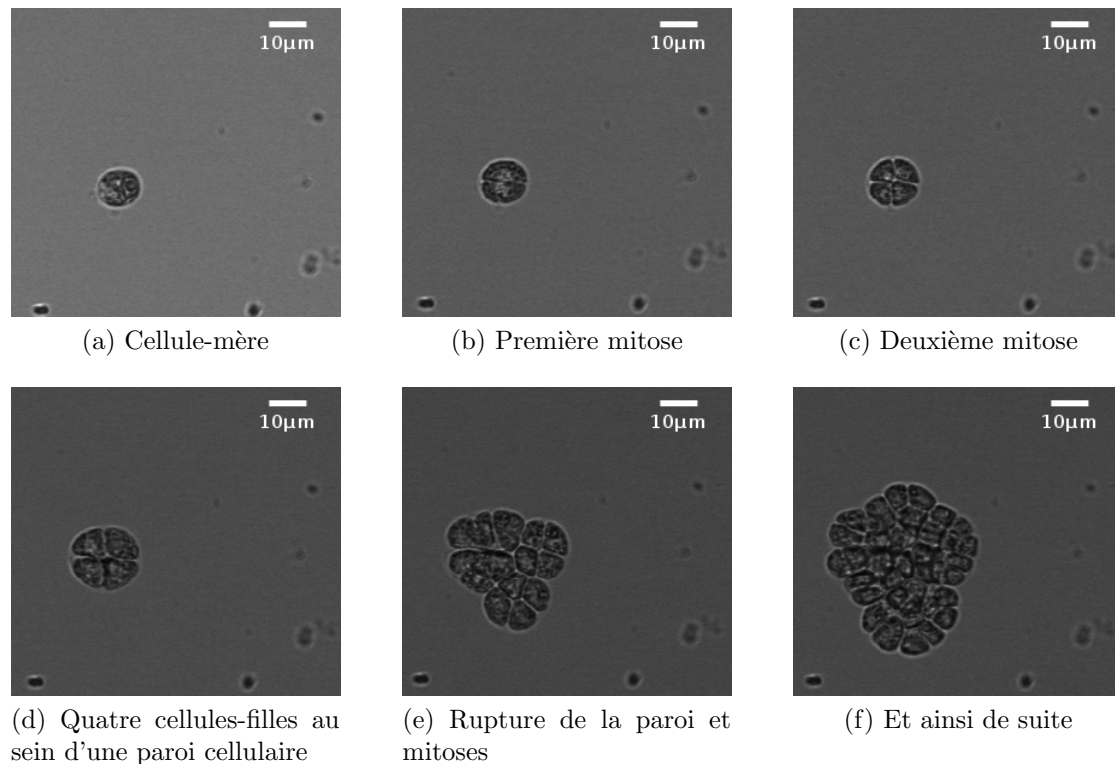


FIGURE 1.8 – La mitose chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

ou encore le papillomavirus humain type 16 [37]. La synthèse et l'assemblage d'anticorps [38], y compris humains [39], par *Chlamydomonas reinhardtii* a été démontrée. la production de protéines à visée thérapeutique chez l'humain a aussi été investiguée avec succès [40].

### Effet de l'éclairage

L'éclairage est un facteur environnemental important pour *Chlamydomonas reinhardtii*. En effet, la lumière régule le cycle cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii*, que ce soit en conditions autotrophes ou mixotrophes [41]. Ainsi, ces microalgues se divisent de manière synchrone à la fin de la phase sombre.

Il est d'usage de faire des cycles jour/nuit, même si certaines espèces peuvent pousser sous illumination constante [42]. Il est habituel d'utiliser des lampes émettant dans le bleu et/ou le rouge, car ce sont les segments du spectre utilisés par les systèmes photosynthétiques.

Les cycles d'éclairage ont aussi un impact sur la conversion photosynthétique [43], ce qui trouve des applications pour les bioprocédés.

### Milieux de culture et souches

Les milieux et les conditions de culture en laboratoire sont connus depuis plusieurs décennies. L'un des milieux le plus utilisé est le TAP [44], qui contient une source de carbone (acétate)



## CONFIDENTIEL

et permet une culture hétérotrophe. Il existe aussi un milieu Minimum, sans cette source de carbone, qui ne permet que la culture autotrophe, ainsi qu'un milieu N0, qui est un TAP privé d'azote. Ce dernier sert à induire la production de lipides chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les compositions de ces milieux sont fournies en annexe.

Un des avantages de *Chlamydomonas reinhardtii* est son temps de doublement, c'est à dire que le temps qu'il faut pour que la concentration d'une suspension de ces microalgues soit doublée. Il est de l'ordre d'une dizaine d'heures sous des conditions de culture optimales. C'est incomparablement plus long que chez une bactérie comme *Escherichia coli* (de l'ordre de 20 minutes), mais sensiblement plus court que chez d'autres microalgues (jusqu'à plusieurs jours chez *Dunaliella tertiolecta* [45]) ou chez des végétaux pluricellulaires.

Nous avons fait le choix de cultiver nos microalgues en conditions mixotrophes, c'est à dire en leur fournissant un substrat organique (de l'acétate) et de la lumière. Cela nous assure une croissance rapide des microalgues, et nous épargne de devoir faire buller de l'air dans nos cultures [46].

De plus, *Chlamydomonas reinhardtii* a besoin d'acétate comme co-substrat pour une production optimale de lipides [47].

Il convient ici de discuter du choix économique lié à la culture en milieu auto- ou mixotrophe. Dans le deuxième cas, les coûts augmentent, mais la croissance est plus rapide. Si cette approche a du sens dans le monde de la cosmétique où les produits peuvent être vendus très cher, il en a beaucoup moins dans celui des biocarburants, où les contraintes de coûts sont très importantes.

Les deux souches que nous avons utilisées sont nommés WTS24- et Sta6CW15. La première est une souche sauvage, largement utilisée par l'IBPC. La deuxième est un mutant qui n'accumule pas d'amidon et accumule les lipides lorsqu'il est carencé en azote. D'autre part, il ne possède pas de paroi cellulaire.

### **Pertinence de l'encapsulation de microalgues**

Les développements de technologies d'encapsulation au laboratoire ont amené l'émergence de projets de recherche en biologie basés sur les capsules.

Léopold Mottet s'est penché durant sa thèse [48] sur l'encapsulation de bactéries électroactives dans une capsule millimétrique constituée d'un gel conducteur. À cette occasion, Léopold a remarqué que le temps de division d'*E. coli* en capsule ne présentait pas de différence avec celui d'*E. coli* en suspension. D'autre part, la concentration bactérienne en capsule était plus élevée qu'en suspension.

Plusieurs projets se sont basés sur les capsules submillimétriques. Une collaboration avec l'Institut Curie a amené le laboratoire à travailler sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses [49]. Cette approche a permis de produire massivement des sphéroïdes de taille contrôlée, et de faire des mesures mécaniques quantitatives sur lesdits sphéroïdes.

D'autres travaux ont mis en jeu des cellules de peau (kératinocytes et fibroblastes), afin de pouvoir reconstruire la structure de la peau en trois dimensions en capsule. Cette approche

## CONFIDENTIEL

permet de se rapprocher des comportements observés *in vivo* bien plus qu'avec des méthodes classiques de culture.

Dans la même approche, des travaux sont en cours au laboratoire et portent sur l'encapsulation d'hépatocytes primaires humains. Les résultats sont très prometteurs puisque la durée de vie de ces cellules est de plus d'un mois en capsule, alors que les mêmes cellules cultivées de manière traditionnelle meurent sous trois jours.

Nous l'avons vu précédemment, des essais sur des microalgues immobilisées dans des billes d'hydrogel ont déjà été réalisés. Cependant, ces technologies ne sont pas capable de recréer les conditions de culture en milieu naturelle, ni de laisser de l'espace aux cellules pour qu'elles puissent croître. Le laboratoire a démontré la valeur ajoutée de ces capsules d'alginate à cœur liquide pour la culture de plusieurs types cellulaires humains et de bactéries, et nous allons faire de même pour la culture de microalgues.

### 1.4 Conclusion

Nous avons vu au cours de ce chapitre l'intérêt que présentent les bioprocédés et facteurs qui ont poussé au développement d'alternatives, en l'espèce les synthèses chimiques.

Face aux défis du futur et aux attentes sociétales, il est intéressant de proposer une nouvelle approche des bioprocédés mettant en jeu une innovation technologique. L'encapsulation est en développement dans l'industrie, y compris dans le domaine de la cosmétique. Nous avons l'intuition que cette approche est pertinente pour les bioprocédés. Fort de son savoir faire et de ses connaissances, le laboratoire est un lieu tout à fait approprié pour mener ces travaux.

Cette thèse est financé par un acteur de la cosmétique. Les microalgues présentent des intérêts forts pour la cosmétique. Les molécules qu'elles sécrètent sont de fait des actifs de choix pour la cosmétique. Ces molécules sont variés, du fait de la grande diversité des microalgues. De plus, les microalgues permettent de développer un discours marketing attractif.

Nous allons par la suite montrer l'intérêt de l'encapsulation pour la culture de microalgues, et pour l'expression de molécules d'intérêt par forçage physiologique (ou élicitation). Nous montrerons aussi une preuve de concept de criblage de séquences de conditions de culture, qui peut avoir un impact tant pour les bioprocédés que pour des thématiques plus fondamentales.

Nous allons maintenant nous pencher sur l'encapsulation de *Chlamydomonas reinhardtii*.

# Chapitre 2

## Encapsulation de *Chlamydomonas reinhardtii*

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Adaptation de la technologie : capsules d'alginate produites par jetting</b>	<b>37</b>
2.1.1	Adaptation du procédé	37
2.1.2	Adaptation des milieux de culture	41
2.1.3	Impact des milieux élaborés sur <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	46
2.1.4	Conclusion	53
<b>2.2</b>	<b>Encapsulation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>54</b>
2.2.1	Illustration du procédé	54
2.2.2	Suivi de croissance en capsule	57
2.2.3	Concentration dans les capsules	66
2.2.4	Conclusion	72
<b>2.3</b>	<b>Décontamination spécifique de la phase continue</b>	<b>72</b>
2.3.1	Moyens classiques de décontamination	73
2.3.2	Utilisation de poly-L-lysine pour décontaminer spécifiquement la phase continue	74
2.3.3	Conclusion	78
<b>2.4</b>	<b>Apport des capsules pour la production de lipides et pour les bio-procédés en général</b>	<b>78</b>
2.4.1	Sécrétion de lipides en suspension	78
2.4.2	Production de lipides par des microalgues encapsulées	81
2.4.3	Simplification des bio-procédés grâce aux capsules	83
2.4.4	Conclusion et perspectives	89
<b>2.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>90</b>

---

## CONFIDENTIEL

Le procédé de fabrication de capsules par jetting décrit ci dessus a été développé dans une optique purement matériau. Il est nécessaire de faire quelques adaptations afin de l'utiliser pour travailler avec des cellules. Il faut d'une part s'assurer de la stérilité du procédé et de la compatibilité physico-chimique des milieux de culture avec les capsules d'alginate. D'autre part, il est nécessaire de s'assurer que ni le procédé d'encapsulation ni les matériaux utilisés n'ont d'impact négatif sur les microalgues.

Ceci fait, nous montrerons les effets de l'encapsulation sur *Chlamydomonas reinhardtii*, en gardant en tête une vision industrielle : le procédé doit être relativement simple, facile à industrialiser, les outils de mesure faciles à mettre en œuvre et non destructeur dans la mesure du possible.

Notre objectif étant de produire des molécules à haute valeur ajoutée (cosmétique et alimentaire), nous pouvons nous permettre d'utiliser un milieu de culture riche. Cela n'est pas le cas lorsque l'objectif est de faire des biocarburants, pour des raisons de coût. Par rapport à la culture en milieu pauvre, la culture en milieu riche permet une croissance plus rapide de *Chlamydomonas reinhardtii*. Cependant, la présence d'un substrat carboné permet aussi la croissance de contaminations. Nous discuterons donc des problèmes que posent les contaminations bactériennes et d'un moyen simple et innovant de les supprimer.

Enfin, nous terminerons par un exemple d'application des capsules pour la production de molécules d'intérêt.

## 2.1 Adaptation de la technologie : capsules d'alginate produites par jetting

Le procédé de fabrication de capsules par jetting a été mis au point pour un travail sur le matériau, et non une application en biologie. Nous avons adapté ce procédé pour répondre aux contraintes biologiques, et les milieux de culture aux contraintes physico-chimiques de notre système.

### 2.1.1 Adaptation du procédé

#### Position du problème : un procédé stérile

Le procédé de fabrication mis au point au laboratoire par Hugo Doméjean [14] et détaillé au chapitre précédent nécessite quelques adaptations pour être utilisé dans un contexte biologique, et ce principalement pour éviter les contaminations. Il est d'autant plus important de les éviter que l'organisme cultivé a un temps de division long par rapport à celui des micro-organismes contaminants. Nous pouvons illustrer simplement ce problème. Typiquement, en milieu riche, une bactérie comme *Escherichia coli* se divise en une vingtaine de minutes, une algue comme *Chlamydomonas reinhardtii* en une dizaine d'heures. Faisons l'hypothèse qu'à un temps donné, une flasque contient 50000 microalgues et qu'une bactérie contaminante arrive dans la flasque. Une dizaine d'heure plus tard, la population de microalgues a doublé et est de 100000 individus. Dans le même temps, la bactérie a généré de l'ordre de  $10^9$  bactéries, soit 10000 fois plus que le

## CONFIDENTIEL

nombre de microalgues présentes dans le milieu. Ces bactéries vont entrer en compétition pour les nutriments et ainsi faire diminuer le rendement en microalgues. D'autre part, la présence de métabolites secondaires générés par les bactéries peut avoir une influence sur la physiologie des microalgues. Enfin, la présence de contamination peut poser des problèmes de purification de la molécule d'intérêt. Il est donc crucial de ne pas introduire de bactérie contaminante lors de la fabrication des capsules.

Tout d'abord, l'intégralité du matériel (tubes, connecteurs, cristallisateur, etc.) utilisé doit être autoclavé. L'injecteur ne peut pas l'être car le matériau ne résiste pas aux hautes températures. Il est rincé abondamment avec de l'éthanol à 70%. Le procédé d'encapsulation se fait en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire.

Tous les liquides doivent être stérilisés. L'autoclavage est une méthode simple de stérilisation de liquides. Le bain de calcium peut l'être sans problème, mais ça n'est pas le cas des solutions de polymères utilisées (alginate et cellulose). En effet, si ces dernières sont portées à 120°C pendant 20 min, leurs propriétés rhéologiques sont altérées à un point qui rend l'encapsulation impossible. Ceci est très vraisemblablement dû au raccourcissement des chaînes de polymères, et à l'interaction moindre qui en résulte. Cela est bien connu au laboratoire, grâce à des mesures réalisées par Mathieu de la Motte Saint Pierre, doctorant au laboratoire, et présentées dans le tableau 2.1.

Solution	Viscosité intrinsèque (Pa.s)
Alginate	2,517
Alginate 20 min à 110°C	0,330
Alginate 30 min à 100°C	0,672

TABLE 2.1 – Impact de l'autoclavage sur les propriétés rhéologiques de l'alginate.

Il est possible de stériliser ces solutions par filtration à 0,2 µm, mais la viscosité de la solution d'alginate impose un débit si bas qu'il faut une nuit pour stériliser 20 mL d'alginate. Ce procédé n'est pas très pratique, de plus il n'est pas industrialisable.

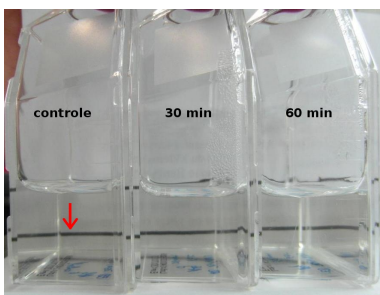
### Pasteurisation des solutions de polymères

Il nous était nécessaire de mettre au point un procédé industrialisable de stérilisation de ces solutions de polymères qui n'altère pas leurs propriétés rhéologiques. Nous avons appliqué avec succès un procédé bien connu dans l'industrie alimentaire : la pasteurisation. Cette méthode met en jeu un temps plus long et une température moins élevée que l'autoclavage, ce qui altère bien moins les propriétés rhéologiques de nos polymères.

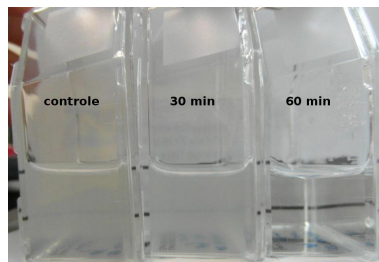
Nous avons établi un protocole simple afin de déterminer le couple temps/température nécessaire pour une pasteurisation efficace. Les solutions de polymères sont préparées, puis elles sont mélangées en conditions stériles avec un volume équivalent de milieu riche (TAP). Si des bactéries se développent dans une flasque, le liquide contenu dans celle-ci devient turbide. L'évolution de la turbidité du liquide est suivie à l'œil. Une feuille blanche sur laquelle est

## CONFIDENTIEL

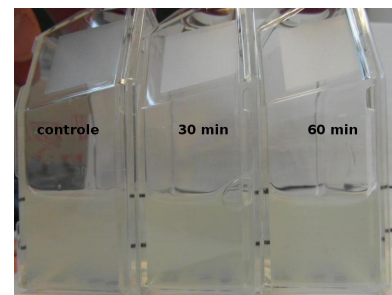
tracé un trait noir est placée derrière les flasques contenant les solutions de polymères. Ce système permet de voir au premier coup d'œil si la solution est turbide : si le trait devient moins net à mesure que la turbidité augmente. Les solutions de polymères sont préparées en dispersant d'une part 1% de cellulose dans de l'eau déionisée, et de l'autre 1.7% d'alginate et 0,5 mM de SDS dans de l'eau déionisée. Nous voulons un procédé relativement rapide, aussi nous fixons arbitrairement deux temps de pasteurisation, un premier de 30 minutes et un deuxième de 60 minutes ; et une température de pasteurisation de 60°C. Les résultats sont présentés en figure 2.1.



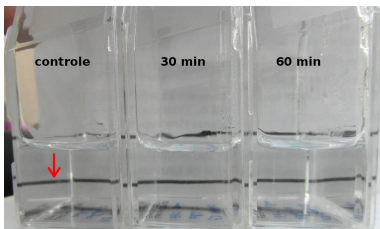
(a) Alginate, avant pasteurisation



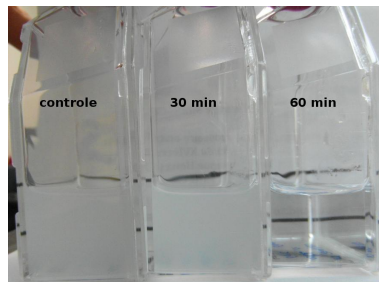
(b) Alginate, jour 2



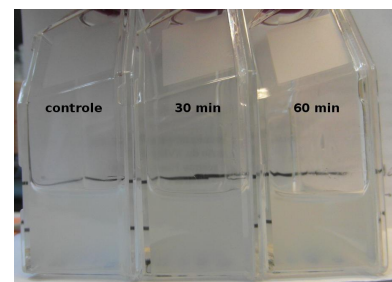
(c) Alginate, jour 4



(d) Cellulose, avant pasteurisation



(e) Cellulose, jour 2

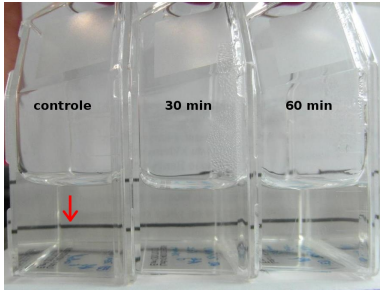


(f) Cellulose, jour 4

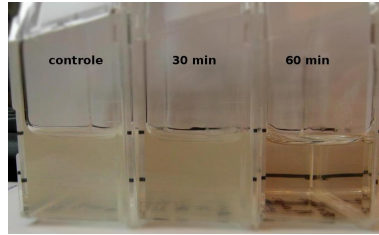
FIGURE 2.1 – Suivi de la pasteurisation des solutions de polymères à 60°C ; Alginate : mélange 50/50 TAP et Alginate 1.7% + SDS 0,5 mM ; Cellulose : mélange 50/50 TAP et Cellulose 1%. Au bout de 4 jours, des contaminations se développent, le procédé n'est pas satisfaisant.

CONFIDENTIEL

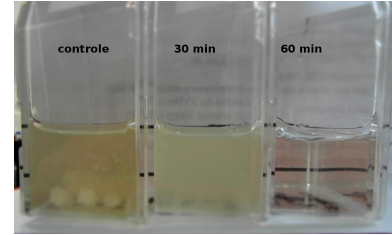
Le contenu des flasques pasteurisés à 60°C est trouble au bout de trois jours, quelque soit la durée de pasteurisation. La pasteurisation à 60°C n'est donc pas suffisante. Nous pouvons cependant augmenter la température de pasteurisation. Nous faisons un essai à 65°C, les résultats sont présentés en figure 2.2.



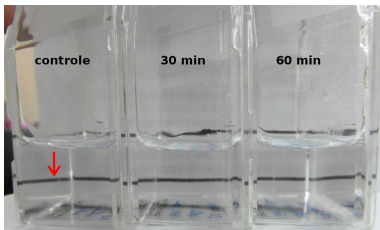
(a) Alginate, avant pasteurisation



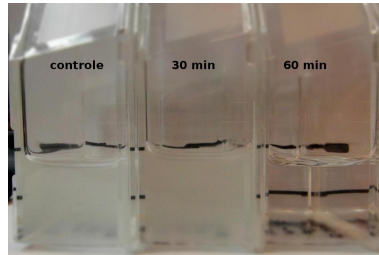
(b) Alginate, jour 5



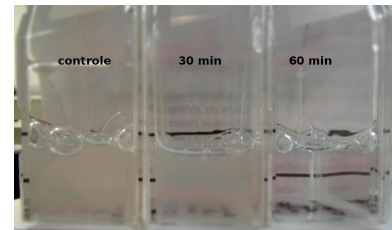
(c) Alginate, jour 19



(d) Cellulose, avant pasteurisation



(e) cellulose, jour 5



(f) cellulose, jour 19

FIGURE 2.2 – Suivi de la pasteurisation des solutions de polymères à 65°C ; Alginate : mélange 50/50 TAP et Alginate 1.7% + SDS 0,5 mM ; Cellulose : mélange 50/50 TAP et Cellulose 1%. Les polymères pasteurisés 60 minutes à 65°C restent stériles plus de trois semaines, le procédé est satisfaisant.

Le contenu des flasques pasteurisées à 65°C est trouble sauf pour celles qui ont subi une pasteurisation pendant 60 min. Ces dernières restent parfaitement limpides pendant 3 semaines. Ces résultats sont tout à fait satisfaisants.

Nous fixons donc le protocole de pasteurisation à 65°C pendant 60 minutes. Des mesures de rhéologies ont ensuite été réalisées par Wafa Bouhlel, doctorante au laboratoire, et sont reportées en figure 2.2.

Solution	Viscosité intrinsèque (Pa.s)
Alginate 1,7%	1,52
Alginate 1,7% 60 min à 65°C	1,42

TABLE 2.2 – Impact du procédé de pasteurisation sur les propriétés rhéologiques de l'alginate.

Nous constatons que les propriétés rhéologiques de l'alginate sont peu impactées par notre

## CONFIDENTIEL

procédé : la viscosité intrinsèque diminue de 6,6%, contre près de 90% suite à un autoclavage. Deux lots différents d'alginate ont été utilisés par Mathieu et Wafa, ce qui explique la différence de viscosité intrinsèque entre les deux ensembles de mesure.

Nous faisons ensuite une fabrication de capsules avec des solutions de polymères pasteurisées, afin de vérifier que le procédé d'encapsulation n'est pas impacté par la pasteurisation des polymères. Ladite encapsulation se déroule sans encombre. La pasteurisation n'impacte donc pas le procédé de fabrication des capsules.

Nous avons donc mis au point un procédé de pasteurisation qui nous assure une décontamination des polymères utilisés sans impacter le procédé.

Maintenant que le procédé est adapté à l'encapsulation de microalgues, nous allons maintenant nous pencher sur l'adaptation des milieux de culture utilisés pour la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 2.1.2 Adaptation des milieux de culture

#### Déstabilisation de l'hydrogel d'alginate par les milieux de culture

La première chose est de s'assurer de la compatibilité de notre système d'encapsulation avec les milieux de culture utilisés pour *Chlamydomonas reinhardtii*.

Nous savons que l'hydrogel d'alginate-calcium peut être déstabilisé en présence de chélatants du calcium. Parmi ces chélatants se trouvent le citrate, l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) ou encore le phosphate. Or le phosphate est souvent utilisé comme molécule tampon dans les milieux biologiques. De plus, la présence de cations monovalents contribue à la déstabilisation du gel, car elle induit une substitution des ions calciums par des cations monovalents. Ainsi, l'hydrogel se déplete en ions calcium, ce qui le déstabilise. Lorsqu'un hydrogel d'alginate-calcium est appauvri en ions calcium, il gonfle et finit par se déstabiliser totalement en se dissolvant dans la solution. Pour illustrer ceci, nous allons placer des billes d'alginate dans un tampon phosphate et observer leur gonflement.

Nous commençons par fabriquer des billes d'alginate. Pour ce faire, une solution d'alginate est préparée en mélangeant 1,7% de poudre d'alginate et 0,5 mM de SDS dans de l'eau distillée. Des billes sont ensuite produites en utilisant notre injecteur, et rincées avec de l'eau distillée. Elles sont conservées dans ce même liquide, elles sont imagées au microscope. Les images sont ensuite analysées pour déduire le rayons de ces billes. Nous mesurons un rayon moyen de  $180,8 \pm 4,1 \mu m$  (42 billes mesurées), soit une polydispersité de 4,5%.

5 mL de tampon phosphate sont versés dans une boîte de Petri. 150 de ces billes sont disposées dans cette boîte et sont imagées avec un objectif 2X à intervalles réguliers, comme schématisé en figure 2.3.



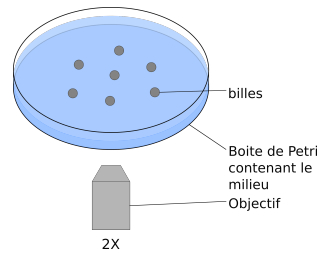


FIGURE 2.3 – Schéma observation de billes au microscope.

Quelques uns de ces clichés sont présentés en figure 2.4. Nous observons bien un gonflement des billes d'alginate. Nous allons maintenant caractériser ce gonflement en suivant l'évolution du rayon des billes. Sur nos clichés, il apparaît qu'il y a un faible contraste entre les billes et la phase continue. Cela nous empêche d'utiliser les techniques de seuillages classiquement utilisées pour détecter des objets. Nous avons donc mis au point une méthode de mesure du rayon des billes qui repose sur une autre technique.

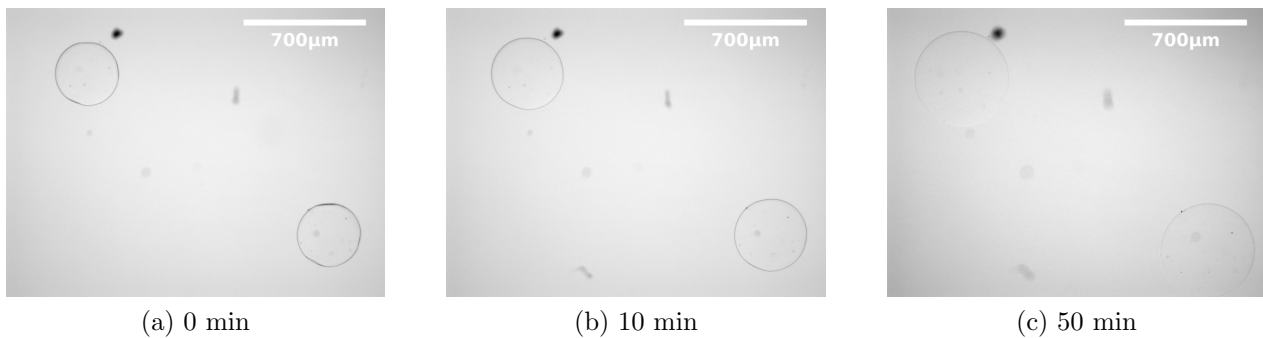


FIGURE 2.4 – Évolution de billes d'alginate dans un tampon phosphate.

### Mesure du rayon des billes

Afin d'analyser facilement nos images, nous nous sommes penchés sur une méthode d'automatisation. Sur les clichés présentés en figure 2.5, les billes présentent un contraste très faible avec la phase continue. Comme l'alginate est composé à 98% d'eau, la différence d'indice optique avec la phase continue aqueuse est faible, donc le contraste est peu marqué. Ceci nous empêche d'utiliser les méthodes classiques de seuillage pour analyser ces images. Nous avons trouvé une méthode alternative pour exploiter nos clichés.

Nous avons décidé d'utiliser MATLAB car c'est un langage puissant, riche et doté d'outils dédiés à l'analyse d'image, dont de la reconnaissance de forme. Nous avons donc élaboré un algorithme qui prend une image, effectue une reconnaissance d'objets circulaires, puis calcule les diamètres des objets trouvés. Une telle reconnaissance est possible en utilisant la Transformée de Hough (Paul Hough, 1962 ; généralisée par Richard Duda et Peter Hart en 1972). Le microscope Nikon Eclipse Ti-E dont nous disposons au laboratoire sort des images au format ND2, qui

## CONFIDENTIEL

peuvent être traitées par MATLAB grâce à la boîte à outils Bio-Formats, développée par le Open Microscopy Environment Consortium<sup>1</sup>. Le script est donné en annexe, et donne d'excellents résultats.

### Gonflement des billes dans les milieux de culture

L'outil de mesure étant au point, nous pouvons commencer les expériences de gonflement de billes d'alginate dans le TAP et le Minimum.

Nous voulons étudier l'impact des milieux de culture sur ces billes. Il nous faut donc placer lesdites billes à potentiel chimique constant dans ces milieux, et surveiller leur gonflement éventuel. Se placer à potentiel chimique constant impose d'avoir une fraction volumique de billes très faible, afin de considérer le milieu de culture comme un réservoir infini.

Les billes que nous avons fabriquées font 180  $\mu\text{m}$  de diamètre. 150 de ces billes dans 5 mL de liquide représente une fraction volumique de 0,07%.

Nous pouvons confirmer par un calcul d'ordre de grandeur que cette dilution est suffisante pour considérer le potentiel chimique comme constant : le monomère de l'alginate a pour formule  $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ . En faisant l'hypothèse qu'il y a au maximum autant d'ions calcium que de monomères d'alginate, nous pouvons calculer que la concentration en ions calcium dans une bille d'alginate est au plus de 90 mM. Si tous les ions calcium contenus dans les 150 billes d'alginate diffusent hors de celles-ci et vont dans les 5 mL de phase continue, la concentration en ion calcium dans la phase continue sera augmentée de 0,06 mM. Ceci est faible par rapport à la concentration en ions calcium déjà présente, qui est de 0,45 mM. Ce calcul nous assure que le gradient en ions calcium reste très important quoi qu'il arrive, et que donc nous pouvons nous considérer à potentiel chimique constant au court de cette expérience.

5 mL de milieu de culture (TAP et Minimum) sont versés dans une boîte de Pétri, puis 150 billes d'alginate sont ajoutées. L'ensemble est agité rapidement puis observé au microscope. Des clichés sont pris toutes les 30 secondes pendant 15 min, puis un cliché est pris au bout de 50 min. Quelques clichés sont montrés en figure 2.5, et les résultats sont présentés en figure 2.6.

On constate que les billes d'alginate gonflent rapidement et dans des proportions significatives. Dans le TAP, l'augmentation de rayon atteint 6% à 15 min, 25% à 30 min et 50% à 50 min. Les résultats sont sensiblement proches dans le Minimum, puisque l'augmentation atteint 5% à 15 min, 22% à 30 min et 50% à 50 min.

Ce gonflement est caractéristique d'un appauvrissement de l'hydrogel en ions calciums. Cet appauvrissement résulte d'une part des chélatants du calcium présents dans ces milieux (TRIS, phosphate) ; et de l'autre de la présence de cations monovalents qui se substituent au calcium. Ce problème est bien connu au laboratoire, et nous avons des solutions satisfaisantes pour y remédier.

---

1. <https://www.openmicroscopy.org/site/products/bio-formats>

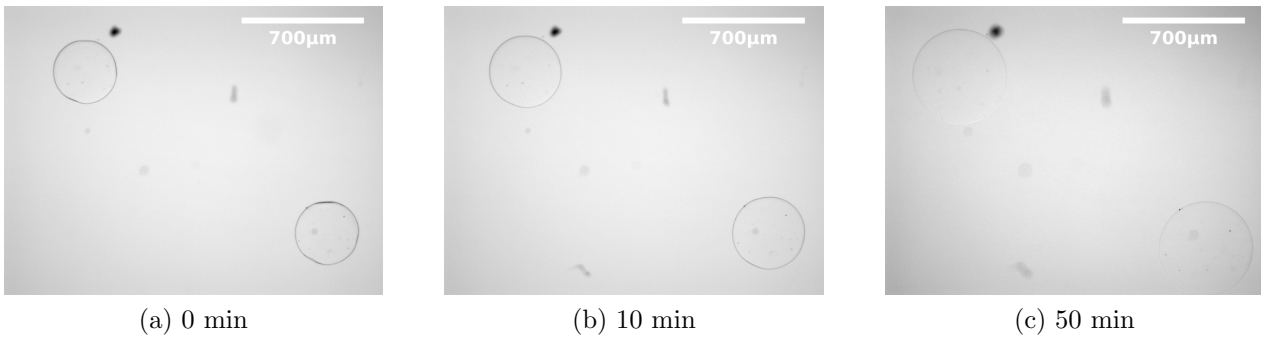


FIGURE 2.5 – Évolution de billes d’alginate dans du TAP.

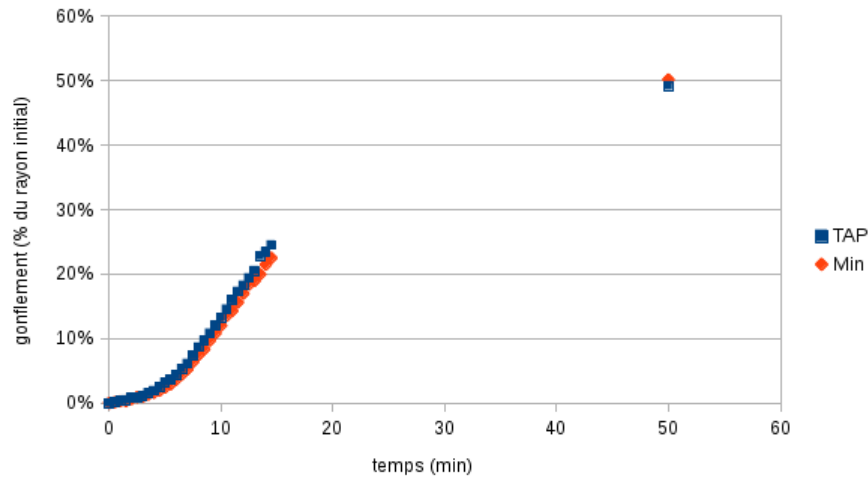


FIGURE 2.6 – Gonflement de billes d’alginate dans le TAP et le Minimum, exprimé en pourcentage du rayon initial.

### Élaboration de milieux de culture compatibles avec la technologie d’encapsulation

La composition des milieux de culture cellulaire répond d’une part à des contraintes biologiques (apport de source d’énergie et de carbone, maintien de la pression osmotique, du pH, etc.), et de l’autre à des habitudes de travail, qui n’ont pas été questionnées et n’ont pas évoluées depuis parfois plusieurs décennies. Si nous pouvons tout à fait nous affranchir de ces habitudes qui n’ont parfois aucune rationalité, il est par contre critique de respecter les contraintes biologiques.

Certains milieux sont dits « riches » et permettent une culture hétérotrophe (catabolisation d’un substrat carboné), d’autres sont dits « pauvres » et ne permettent que la culture autotrophe (photosynthèse). Nous nous sommes alignés sur ce que nos collaborateurs à l’IBPC utilisent, à savoir le TAP [44], le N0 et le Minimum. La composition de ces milieux est donnée en annexe (cf table A.1, A.2 et A.3). le TAP est un milieu riche, contenant de l’acétate ; le N0 est un milieu riche ne contenant pas d’azote et permettant l’induction de l’accumulation de lipides chez la

## CONFIDENTIEL

souche Sta6CW15 ; le milieu Minimum est, comme son nom l'indique, un milieu pauvre.

Un examen de la composition de ces milieux et des recettes de préparation nous permet de comprendre comment ils sont structurés. Pour le TAP par exemple, l'acétate est la source de carbone, le pH est maintenu par le TRIS, et plusieurs éléments minéraux (cobalt, fer, manganèse, etc.) sont présent à l'état de trace et contribuent à la physiologie des microalgues.

Pour résoudre ces problèmes de milieux de culture non compatibles avec les capsules d'alginate, il suffit de supprimer les chélatants du calcium, et d'ajouter une faible quantité de chlorure de calcium (1 mM). Nous avons donc élaboré des milieux compatibles avec les capsules en suivant ces principes. Pour le TAP et le N0, nous supprimons le TRIS. Cependant, le TRIS est une molécule tampon, et nous ne pouvons pas le supprimer sans impacter le pH du milieu. Il nous faut le remplacer par un équivalent qui ne chélate pas le calcium. Heureusement, nous avons depuis longtemps identifié au laboratoire une telle molécule : l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES). C'est un composé organique zwitterionique, et est très stable à des pH proches de 7. Le TRIS est donc remplacé par de l'HEPES à 50 mM. Il est nécessaire d'apporter du phosphate si nous voulons que la population de microalgues croisse. En effet, le phosphate est un des composants de l'ADN, et sans apport de phosphate, nous ne pourrions pas avoir de réplication et donc pas de division cellulaire. Nous conservons donc 2,7 mM de phosphate. Cette concentration a été fixé arbitrairement, car nous ne souhaitons pas passer du temps à optimiser les milieux de culture. Nous ajoutons enfin 1 mM de chlorure de calcium. Pour le Minimum, nous procédons de même : la concentration en phosphate est baissée à 2,7 mM, 50 mM d'HEPES et 1 mM de chlorure de calcium sont ajoutés. Ces nouveaux milieux sont nommés respectivement Rich Capsule Compatible Medium (RCCM), N0 Capsule Compatible Medium (N0CCM) et Minimum Capsule Compatible Medium (MCCM).

Il convient maintenant de vérifier si ces milieux sont bien compatibles avec la technologie de capsules d'alginate, et n'induisent pas de gonflement. Nous utilisons l'outil mis au point précédemment pour effectuer cette vérification.

Pour ce faire, 5 mL de milieux de culture (RCCM et MCCM) sont versés dans une boîte de Pétri, puis 10  $\mu$ L de billes sédimentées sont ajoutés. L'ensemble est agité rapidement puis observé au microscope. des clichés sont pris toutes les 30 secondes pendant 15 min, puis un cliché est pris au bout de 50 min. Quelques images sont présentées en figure 2.7, et les résultats sont présentés en figure 2.8.

Le gonflement est nul pour le MCCM et inférieur à 2% pour le RCCM. Nous avons divisé par un facteur 20 le gonflement des billes. Cela est satisfaisant. Nous avons ainsi élaboré des milieux compatibles avec notre technologie. La composition de ces milieux est donnée en annexe (cf table A.4, A.5 et A.6) ; de même que les protocoles de préparation.

Il reste maintenant à nous assurer que ces milieux n'ont pas d'impact sur la croissance des microalgues.

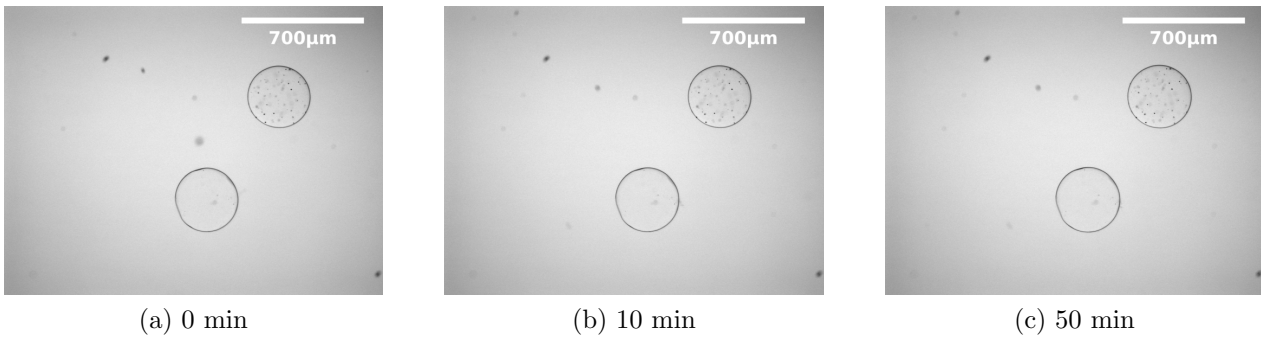


FIGURE 2.7 – Évolution de billes d’alginate dans du RCCM, à potentiel chimique constant.

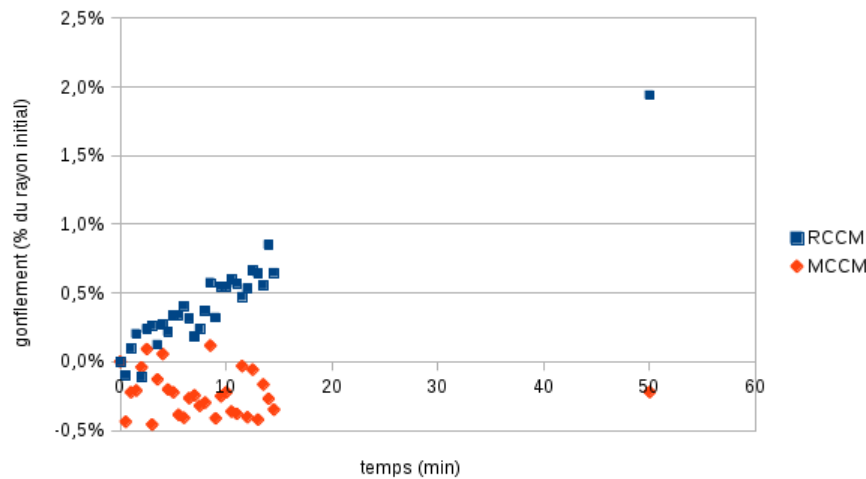


FIGURE 2.8 – Gonflement de billes d’alginate dans le RCCM et le MCCM, exprimé en pourcentage du rayon initial.

### 2.1.3 Impact des milieux élaborés sur *Chlamydomonas reinhardtii*

#### Position du problème et méthodes classiques de suivi de croissance

Nous avons modifié la composition des milieux de culture afin de les rendre compatibles avec notre système d’encapsulation. Il est nécessaire de nous assurer que ces modifications n’altèrent pas la physiologie de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Tout d’abord, nous nous assurons que l’osmolarité de ces milieux est comparable à celle des milieux classiquement utilisés. L’osmolarité est le nombre de moles de soluté dissoutes par litre de solvant. Cette grandeur est directement reliée à la pression osmotique. Or un milieu avec une osmolarité trop forte (hypertonique) ou trop faible (hypotonique) provoque chez les cellules des phénomènes d’osmose qui affectent sa physiologie.

L’osmolarité est mesurée grâce à un osmomètre cryoscopique Osmomat 030. Les résultats

## CONFIDENTIEL

sont récapitulés dans le tableau 2.3. L'osmolalité des milieux capsules-compatibles est comparable à celle des milieux classiquement utilisés, aussi ne poseront-ils pas de problème d'hyper- ou d'hypotonicité.

Milieu	Osmolarité (mOsm)
TAP	91
RCCM	94
Minimum	59
MCCM	50

TABLE 2.3 – Osmolarité des milieux classiques et capsules-compatibles.

La question de l'influence des milieux sur la physiologie de *Chlamydomonas reinhardtii* soulève la question des paramètres à observer. Il peut s'agir de choses assez accessibles comme la morphologie, le spectre d'absorption, la croissance de la population. Il y a d'autres paramètres beaucoup plus complexes, coûteux et difficiles à mesurer, notamment les modifications de l'expression de l'ADN ou encore les modifications du métabolome.

Nous avons fait le choix de nous cantonner à un paramètre fonctionnel, simple d'accès, et qui nous semblait tout à fait pertinent pour mesurer l'impact des milieux capsules-compatibles sur *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous avons réalisé les courbes de croissance de notre microalgue favorite dans le TAP et le RCCM. Nous n'avons pas mesuré celles dans le Minimum et le MCCM car cette expérience aurait duré trop longtemps, et n'aurait pas apporté quelque chose de pertinent.

Traditionnellement, la concentration en microalgues dans une suspension est mesurée soit grâce à une cellule de Malassez, soit grâce à un cytomètre, soit grâce à une mesure d'absorbance par un spectrophotomètre.

L'utilisation de la cellule de Malassez est simple, cependant les résultats sont d'une reproductibilité médiocre (coefficient de variation d'une dizaine de mesures autour de 20%). Le cytomètre donne des résultats plus précis (coefficient de variation de l'ordre de 10%), mais au prix d'une certaine lourdeur d'utilisation. Travailler avec des micro-organismes photosynthétiques est un avantage ici, car nous pouvons tirer partie de la fluorescence du chloroplaste pour mieux détecter les cellules. Enfin, en ce qui concerne les mesures d'absorbance, un spectrophotomètre est très simple d'utilisation et donne des résultats précis, cependant ceci impose de construire une courbe de calibration afin de pouvoir relier l'absorbance à une concentration en cellules.

Dans le cadre de la portée industrielle de notre travail, nous souhaitons développer un système de mesure qui n'impose pas de prélèvement, afin de préserver la stérilité des cultures, et qui soit simple à mettre en œuvre. Aucun système commercial ne répondait à nos exigences, aussi nous avons réfléchi à la mise au point d'un tel système de mesure. Nous nous sommes intéressés aux mesures d'absorbance pour leur simplicité et leur précision, et à faire ces mesures en flasque pour l'aspect stérilité et simplicité de manipulation.

### Mise au point d'un système de mesure d'absorbance en flasque

Nous commençons cette partie par un rappel théorique sur l'absorbance, qui pourra être complété au besoin par de la littérature [50]. L'absorbance, ou densité optique (DO), est le logarithme du ratio de la puissance lumineuse incidente sur la puissance lumineuse transmise à travers un matériau. Il reflète la capacité d'un milieu à absorber et à diffuser la lumière qui le traverse. Notons  $A$  l'absorbance,  $P_0$  la puissance lumineuse initiale à une longueur d'onde donnée et  $P$  la puissance lumineuse transmise à cette même longueur d'onde. L'absorbance est donnée par l'équation 2.1 :

$$A = \log_{10} \frac{P_0}{P} \quad (2.1)$$

Il existe une relation linéaire entre la DO et le nombre d'objets qui absorbent la lumière. Autrement dit il existe une relation entre la DO, la concentration en objets et la longueur du chemin optique. Cette relation, nommée loi de Beer-Lambert, est donnée par l'équation 2.2, où  $\epsilon$  le coefficient d'extinction,  $l$  la longueur du chemin optique et  $c$  la concentration en objets.

$$A = \epsilon l c \quad (2.2)$$

Lorsque qu'un faisceau de lumière traverse une suspension de particules, une partie de la lumière est absorbée et une partie est diffusée. Celle ci sort de la cuve avec un angle  $a > 0$ , comme illustré en figure 2.9, et n'est pas capté par le détecteur.

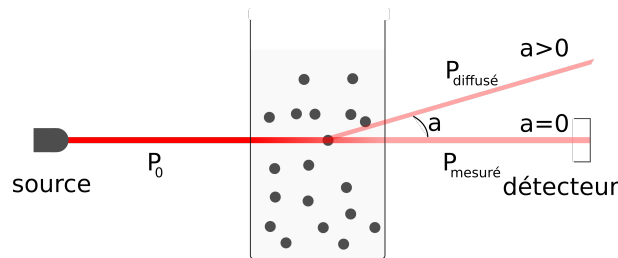


FIGURE 2.9 – Mesure d'absorbance.

Raisonnons en terme de puissance lumineuse envoyée par la source :  $P_0 = P_{\text{absorbé}} + P_{\text{diffusé}} + P_{\text{mesuré}}$ , ainsi, la perte de la lumière diffusée introduit un écart à la loi de Beer-Lambert. En théorie, ces phénomènes de diffusion multiple apparaissent à une DO supérieure à 0,4 en cuvette. En pratique, il a été montré [50] que pour des angles faibles ( $a \ll 1$ ) ces phénomènes sont négligeables jusqu'à des valeurs de DO de 10 (en cuvette).

Nous faisons l'hypothèse que les micro-organismes ont une taille et des propriétés optiques constantes. Cette hypothèse est forte. Elle est perçue par certains comme audacieuse, car les propriétés optiques varient a priori au long du cycle cellulaire (croissance des micro organismes, etc.). En pratique, cette hypothèse est bien vérifiée, et les mesures de DO sont cohérentes, précises et répétables. Aussi, il est commode d'utiliser une mesure de DO pour mesurer la concentration d'une suspension de micro-organismes.

## CONFIDENTIEL

Nous avons donc construit notre propre montage de mesure d'absorbance en flasque de culture cellulaire, représenté en figure 2.10. Ce montage permet une mesure rapide et précise de la concentration en microalgues dans une flasque de culture 25 cm<sup>2</sup>. Une diode laser (CPS196, Thorlabs, longueur d'onde d'émission : 635 nm) est montée à une extrémité de rails. À l'autre bout de ces rails est monté un photodétecteur (PDA36A-EC 4,5 mW, Thorlabs) équipé d'un filtre notch Thorlabs (filtre coupe-bande très étroit, 25 nm centré sur 633 nm). Le signal du photodétecteur est lu grâce à une unité d'acquisition (Agilent 34972A).

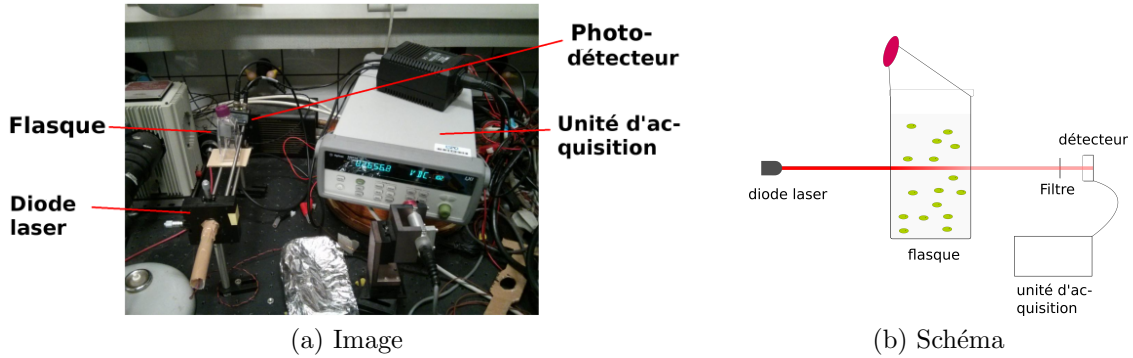


FIGURE 2.10 – Mesure de DO en flasque.

La mesure se fait ainsi : la flasque est placée sur les rails, puis la tension affichée,  $V_{\text{mesuré}}$  est notée. La flasque est ensuite retirée, puis la tension affichée,  $V_{\text{noir}}$ , est notée. La DO est calculée selon la formule 2.3, où  $V_{\text{noir}}$  est la tension affichée par l'unité d'acquisition lorsque le laser est éteint. La flasque est placée sur le dispositif de manière à ce que le laser impacte toujours au même endroit de celle-ci, ainsi aucune variation n'est introduite lors de la mesure.

$$\text{DO} = \log_{10} \left( \frac{V_{\text{référence}} - V_{\text{noir}}}{V_{\text{mesuré}} - V_{\text{noir}}} \right) \quad (2.3)$$

Nous pouvons passer à la mesure effective d'une concentration de microalgues. Il s'agit de relier la mesure de DO à une concentration. Comme dit précédemment, il existe une relation linéaire entre la DO et la concentration en microalgues. Nous construisons une courbe de calibration (DO en fonction de la concentration en microalgues).

### Calibration du système de mesure

L'établissement d'une courbe de calibration permet de relier la DO mesurée à la concentration en microalgues.

Il est possible de mesurer précisément la concentration en microalgues en utilisant un cytomètre. Cette mesure est d'autant plus simple avec les microalgues que l'on peut tirer partie de la fluorescence du chloroplaste pour les détecter, comme montré en figure 2.11. Nous mesurons la DO de plusieurs suspensions de microalgues de concentrations différentes, lesquelles sont ensuite mesurées au cytomètre.



CONFIDENTIEL

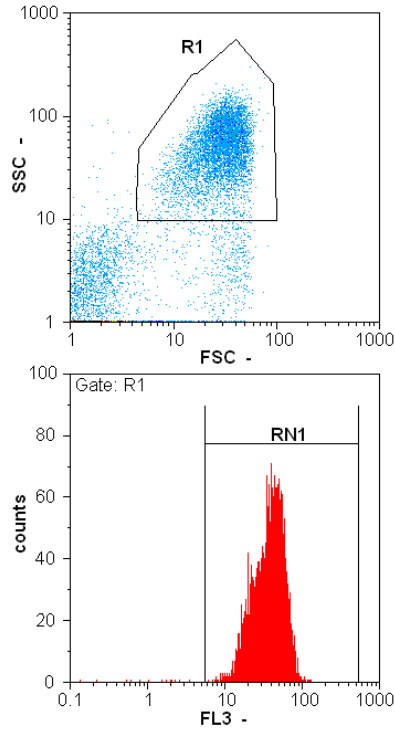


FIGURE 2.11 – Comptage au cytomètre ; les algues sont repérées grâce à la diffusion de lumière (FSC/SSC) et leur signal de fluorescence (675 nm).

Cette courbe de calibration est présentée en figure 2.12, et a été réalisée avec la souche WTS24-. Nous trouvons bien une droite, et une régression linéaire donne la relation 2.4, avec un  $R^2 = 0,947$

$$DO = 2,90.10^{-6} * [\text{cellules}] + 0,340 \quad (2.4)$$

Nous pouvons caractériser ce système de mesure en calculant sa limite de détection et sa gamme de mesure.

La limite de détection (LOD) correspond à la plus petite valeur de concentration effectivement mesurable par l'appareil et statistiquement différente de la valeur de DO du blanc. La DO du blanc est mesurée une dizaine de fois, et la LOD est calculée par la concentration équivalente à la DO du blanc plus trois fois l'écart type. Il suffit donc de faire dix mesures de blanc, en mesurant la DO d'une flasque contenant uniquement du milieu de culture. Ces mesures donnent une LOD de 5860 cellules/mL.

La gamme de mesure correspond à l'étendue des valeurs mesurables par le dispositif. Pour la déterminer, il nous faut trouver la plus haute valeur de DO mesurable. Cette valeur correspond à la DO du noir moins ses variations. Nous mesurons dix fois  $V_{\text{noir}}$ , à savoir  $V_{\text{mesuré}}$  laser éteint.

CONFIDENTIEL

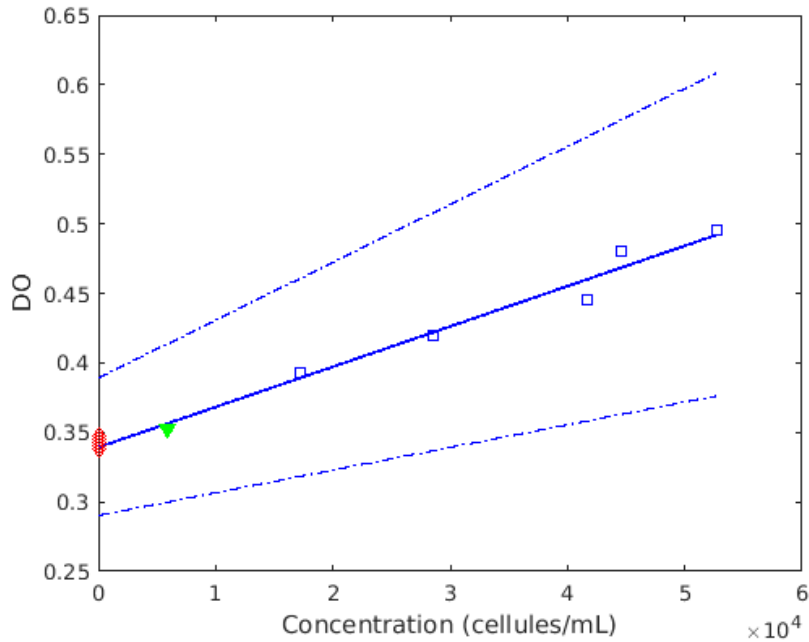


FIGURE 2.12 – Courbe de calibration ; les points rouges correspondent au mesure du blanc et le triangle vert à la LOD.

Nous calculons ensuite  $V_g = \mu + 3\sigma$ , où  $\mu$  est la moyenne des mesures et  $\sigma$  l'écart type. Cette valeur est ensuite injectée dans l'équation 2.3, et nous donne une DO maximale mesurable de 4,654. De cette valeur, nous déduisons la concentration cellulaire maximale mesurable :  $1,49 \cdot 10^6$  cellules/mL.

Nous avons donc établi que la gamme de concentration mesurable couvre de 5860 à  $1,49 \cdot 10^6$  cellules/mL. Si la LOD est toute à fait satisfaisante, la valeur haute de cette gamme est un peu juste. En effet, on trouve dans la littérature [51] que *Chlamydomonas reinhardtii* peut atteindre des concentrations de  $10^7$  cellules/mL, mais vers la fin de la phase exponentielle uniquement. Ceci est largement suffisant car les valeurs typiques de concentration cellulaire auxquelles nous allons travailler en flasque sont de l'ordre de 100 000 à 1 000 000 cellules/mL. Nous pourrions augmenter la puissance du laser, mais ceci nous obligerait à utiliser des lasers de puissance supérieure à 5 mW, donc de classe 3B ou 4. Cela va avec une augmentation des contraintes de manipulation, et d'un possible impact délétère sur les microalgues. Le fait que la flasque soit disposée dans la longueur sur le dispositif de mesure a aussi un impact. En effet, la longueur du chemin optique à travers la suspension de microalgues est de 4,5 cm, soit un facteur 4,5 par rapport aux cuvettes dans lesquelles les mesures de DO sont classiquement réalisées. La concentration maximale en microalgues que nous pouvons mesurer est donc 4,5 fois plus basse que si les mesures étaient faites dans une cuvette. Comme souligné plus haut, cette méthode de mesure de DO en cuvette pose des contraintes en terme de stérilité et de facilité dont nous avons préféré nous affranchir.

Nous avons monté avec succès un appareil de mesure de DO en flasque. Nous pouvons maintenant suivre la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* dans le TAP et le RCCM.

### Suivi de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* dans le TAP et le RCCM

L'objectif est de voir si les changements de composition que nous avons effectués pour rendre le TAP compatible avec notre système d'encapsulation impacte la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour ce faire, nous suivons ladite croissance dans chacun de ces milieux.

Nous nous sommes cantonnés aux milieux riches, car ils permettent une croissance plus rapide des microalgues. Il est possible d'accélérer la croissance des microalgues dans le milieu Minimum en apportant du dioxyde de carbone dans le milieu de culture, cependant il aurait été assez fastidieux de mettre au point un système de bullage de gaz dans une flasque. D'autre part, la seule différence entre le RCCM et le MCCM étant la présence ou l'absence d'acide acétique, nous sommes assurés que si le RCCM n'a pas d'impact sur la croissance des microalgues, le MCCM fera de même.

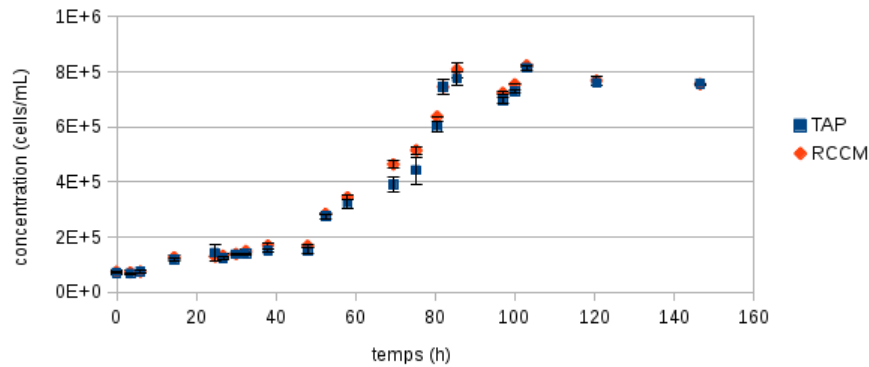


FIGURE 2.13 – Croissance de WTS 24- dans le TAP et le RCCM.

On distingue clairement sur ce graphique une phase exponentielle, qui se termine à 100 h. Elle est suivie d'une phase stationnaire.

Afin de comparer ces deux courbes, nous représentons en figure 2.14 les points correspondants à la phase exponentielle, puis nous effectuons une régression linéaire. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration.

Les deux courbes correspondent avec une très bonne adéquation à une droite, ce qui confirme que l'on est en phase exponentielle. Les coefficients directeurs des droites de régression permettent de remonter aux temps de division des microalgues dans chacun des milieux. En effet, sous l'hypothèse que le temps de division est constant, la dynamique de la population s'écrit selon l'équation 2.5, où  $N(t)$  est le nombre de cellules à l'instant  $t$ ,  $N_0$  le nombre initial de cellules, et  $t_D$  le temps de division :

$$N(t) = N_0 \cdot 2^{\frac{t}{t_D}} \quad (2.5)$$

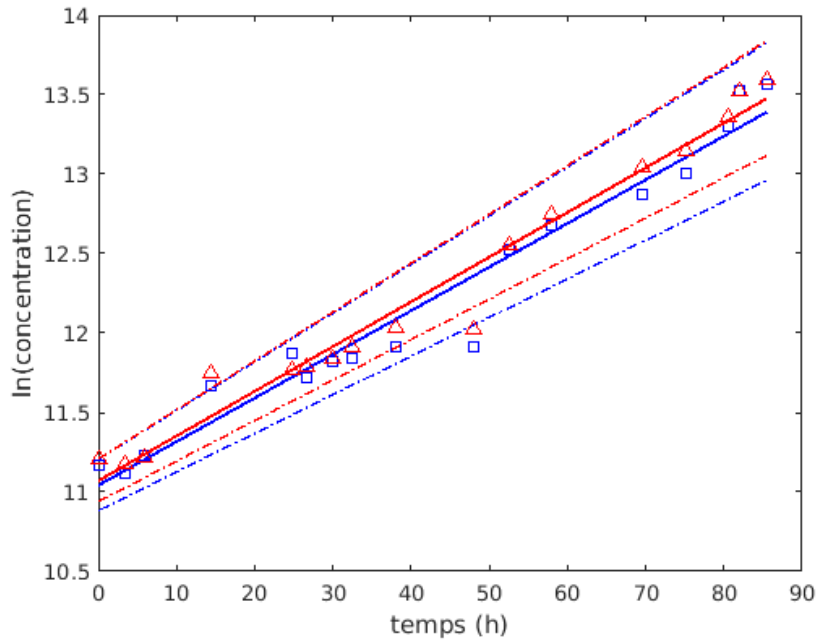


FIGURE 2.14 – Phase exponentielle WTS 24- dans le TAP et le RCCM. Sur l’axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration.

Ainsi, en passant au logarithme, et en appelant  $a$  la pente de la droite qui fitte le mieux aux données, il vient :

$$t_D = \frac{\ln(2)}{a} \quad (2.6)$$

Nous trouvons, pour la TAP, un temps de division de  $25, 2 \pm 2, 9$  h dans le TAP, de  $24, 7 \pm 2, 3$  h dans le RCCM. Ces temps sont un peu élevés par rapport à ce qui est trouvé dans la littérature dans des conditions optimales [52], mais nous ne sommes pas *a priori* dans des conditions optimales. L’ordre grandeur étant le même, ces valeurs ne sont pas choquantes. Quoi qu’il en soit, les temps de division dans le TAP et le RCCM ne sont pas significativement différents, aussi nous pouvons affirmer que les changements que nous avons apportés aux milieux n’ont pas affecté significativement la physiologie de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ainsi, nous avons montré que les modifications que nous avons apportées pour rendre le milieu TAP compatible avec les capsules d’alginate n’ont pas d’impact sur la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### 2.1.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons montré l’existence d’un problème de compatibilité entre les milieux de culture classiquement utilisés pour la culture de *Chlamydomonas reinhardtii* et

notre système d'encapsulation. Nous avons bien compris ce problème, et nous avons mis au point des outils pour mesurer sur cette déstabilisation. Cette incompatibilité réside dans une déstabilisation du gel causé par une substitution et une chélation des ions calcium. Nous sommes à même de le résoudre, en mettant au point un milieu de culture compatible avec les capsules d'alginate. Nous avons ensuite mis au point des outils de mesure pour mesurer simplement et rapidement la croissance des microalgues en conditions stériles, et nous montrons enfin que les milieux que nous élaborons ne modifient pas la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Maintenant que nous pouvons travailler avec des capsules dans des milieux qui n'impactent pas la croissance de nos microalgues, nous pouvons encapsuler ces dernières et nous intéresser aux effets de l'encapsulation.

## 2.2 Encapsulation de *Chlamydomonas reinhardtii*

Dans cette partie, nous commencerons par illustrer le procédé d'encapsulation. Nous nous intéresserons à l'impact de l'encapsulation sur les microalgues. Nous mettrons tout d'abord en évidence l'absence d'impact négatif sur la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*, grâce à un outil développé par nos soins. Nous nous intéresserons ensuite aux effets de l'encapsulation sur la concentration de microalgues en capsule. Enfin, nous mettrons en évidence l'intérêt des capsules pour les bioprocédés en général, et plus particulièrement pour l'induction de la production de lipides chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 2.2.1 Illustration du procédé

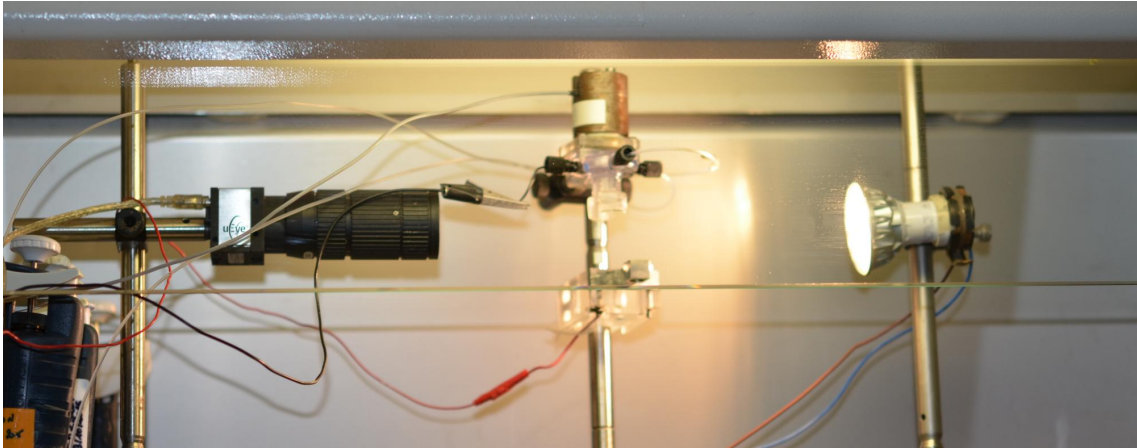
Comme mentionné précédemment, le matériel est autoclavé, de même que le bain de calcium (90 mM et quelques gouttes d'une solution de Tween 20 10%<sub>m/v</sub>); la concentration en calcium a été ajustée afin de ne pas provoquer de choc osmotique, et cet ajustement n'empêche pas la bonne formation des capsules. Les solutions de polymères (cellulose 1% dans HEPES 50 mM; alginate 1,7% + SDS 0,5 mM dans HEPES 50 mM) sont pasteurisées. Le SDS présente une toxicité pour les cellules. Il convient donc d'utiliser cette molécule à sa plus basse concentration possible. En l'occurrence, Hugo Doméjean a déterminé [14] que l'on pouvait abaisser cette concentration à 0,5 mM sans perturber le procédé.

L'injecteur est abondamment lavé avec de l'alcool à 70%.

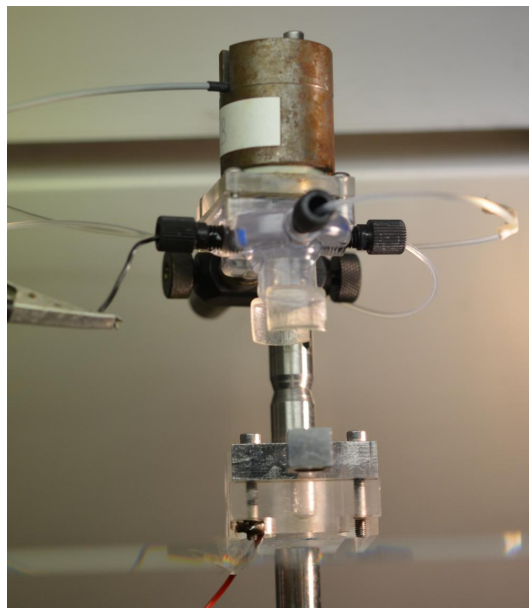
Trois potences sont montées sur une plaque Thorlabs. L'une porte une lampe, la deuxième l'injecteur et l'électrode, la troisième la caméra IDS UI-1240SE. L'ensemble est passé à l'alcool à 70% avant d'être placé sous une hotte à flux laminaire. Les tubes et les connecteurs sont assemblés sous la hotte. Les seringues en verre sont passées à l'alcool à 70% puis laissées à sécher sous la hotte. L'une est remplie avec de l'alginate, puis connectée au tube et mise sur un pousse-seringue. La deuxième reçoit un mélange 50/50<sub>v/v</sub> de cellulose 1% et d'une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii* puis est mise sur un deuxième pousse-seringue. L'injecteur est ensuite rempli d'eau déionisée stérile, puis les tubes sont précautionneusement connectés à l'injecteur afin de ne pas introduire de bulles d'air. L'injecteur est fixé à la potence et le dispositif piézo-électrique est ensuite ajouté sur la partie haute de l'injecteur, comme montré

## CONFIDENTIEL

en figure 2.15. L'électrode est fixée à la même potence et placée proche de l'injecteur, prête à servir. Une poubelle est placée à l'aplomb de l'injecteur, et un cristalliseur contenant le bain de calcium est préparé à proximité.



(a) Montage sous hotte à flux laminaire, en conditions stériles. On distingue, de gauche à droite, la caméra, l'injecteur et l'électrode, et enfin la lampe.

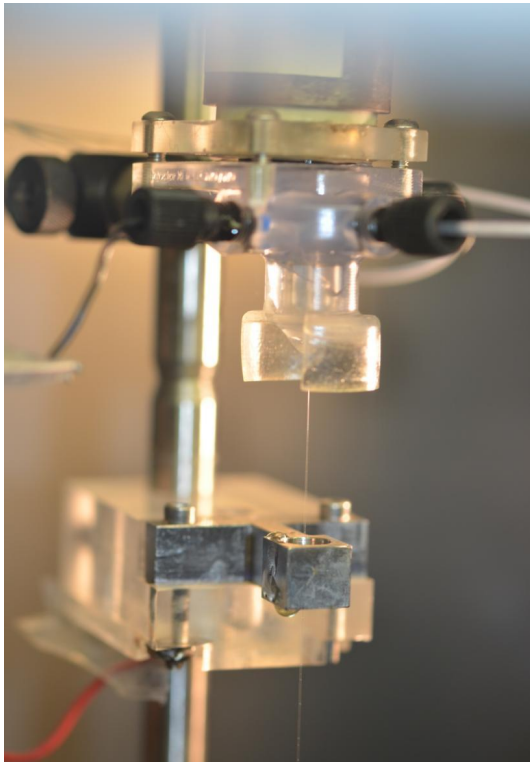


(b) Vue rapprochée, on distingue de haut en bas le dispositif piézoélectrique, l'injecteur avec les arrivées de fluides et la mise à la masse, l'électrode et son alimentation

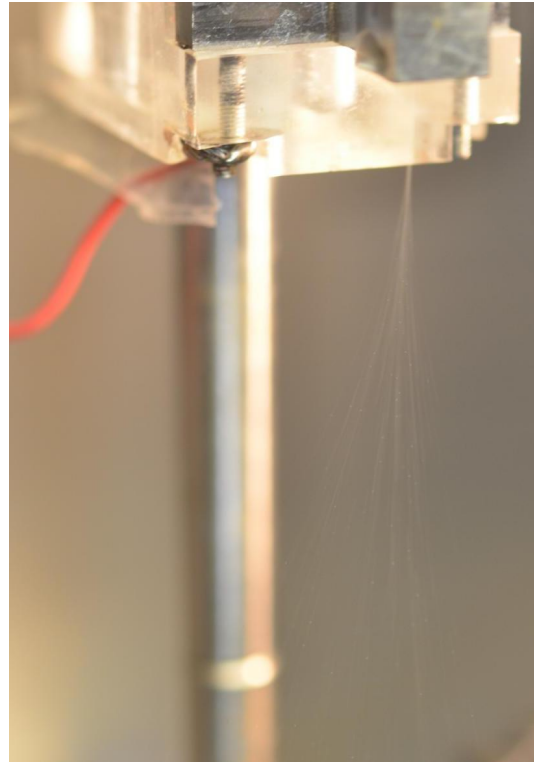
FIGURE 2.15 – Dispositif de fabrication de capsules.

Les fluides sont ensuite envoyés. Les débits typiques sont de 70 mL/h pour la solution de coque et de 130 mL/h pour la solution de cœur. Le dispositif piézo-électrique est ensuite mis sous tension, et la fréquence d'excitation est ajustée (typiquement autour de 1,6 kHz) afin

d'obtenir une fragmentation nette. Ceci est contrôlé avec la caméra. Ceci fait, l'électrode est mise sous tension, typiquement à 1000 V. Cette électrode permet de charger les gouttes. Les répulsions induites amènent les gouttes à s'éloigner, ce qui transforme le jet en cône, comme montré en figure 2.16. La coalescence en vol est ainsi fortement réduite. Cela permet d'obtenir une population de gouttes, et donc de capsules très monodisperse. Le bain de calcium est ensuite placé à l'aplomb de l'injecteur, et les capsules sont collectées. Un cliché de capsules vides est présenté en figure 2.17.



(a) Vue du jet, électrode hors tension



(b) Vue du jet, électrode sous tension. Les gouttes sont bien dispersées et la coalescence en vol est ainsi fortement réduite. Cela permet d'obtenir une population de capsules très monodisperse.

FIGURE 2.16 – Effet de l'électrode sur le jet.

Une fois la collecte terminée, les capsules sont laissées quelques minutes dans le bain de calcium, puis sont filtrées grâce à un tamis cellulaire (maille 100  $\mu\text{m}$ ). Les capsules sont ensuite lavées avec du milieu de culture compatible capsule (typiquement RCCM), puis placées dans une flasque contenant du milieu de culture additionné de 100  $\mu\text{g/mL}$  d'ampiciline, comme montré en figure 2.18.



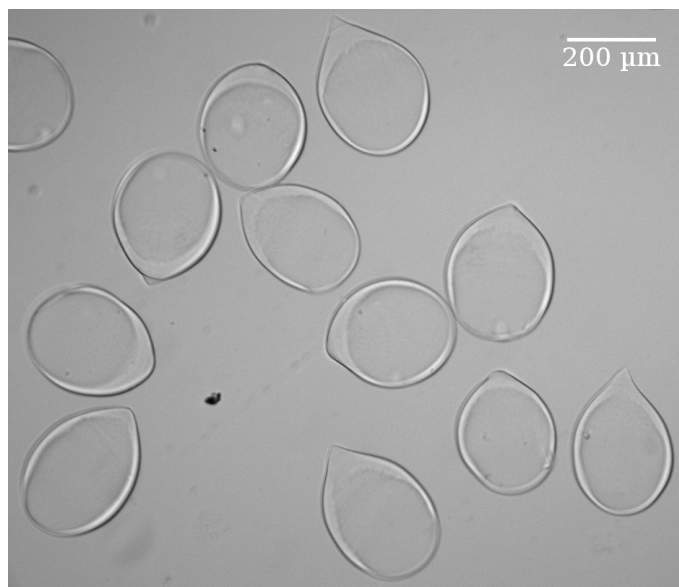


FIGURE 2.17 – Capsules vides observées au microscope optique, grossissement 4x.



FIGURE 2.18 – Après collecte, les capsules sont lavées et transférées dans une flasque contenant du milieu de culture.

## 2.2.2 Suivi de croissance en capsule

### Position du problème

La question de l'impact de l'encapsulation sur la physiologie de *Chlamydomonas reinhardtii* se pose. En effet, l'encapsulation soumet les fluides à un fort taux de cisaillement, et nous ignorons si ceci a un impact sur les microalgues. De plus, la présence de SDS dans la solution de coque peut aussi être une source de problème pour la viabilité des cellules. Enfin, nous ignorons l'impact des polymères utilisés (cellulose et alginate) sur nos microalgues. De la même manière que nous avons choisi d'observer la croissance de cette microalgue pour étudier l'impact



## CONFIDENTIEL

de l'adaptation des milieux de culture, nous allons observer la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* en capsule afin de statuer sur l'impact de l'encapsulation.

Pour cela, il nous faut un outil pour mesurer la concentration de microalgues dans les capsules. Deux stratégies sont possibles. Nous pouvons prélever des capsules, en dissoudre la membrane puis faire une mesure de DO ou de la cytométrie. Ceci présente des inconvénients notables ; c'est une technique destructrice, et nécessite d'ouvrir la flasque de culture à intervalle réguliers. Ce n'est pas souhaitable dans une optique industrielle. L'alternative est de développer une méthode de mesure de DO en flasque afin de pouvoir faire un suivi non destructif et précis de la concentration en microalgues dans nos capsules.

Nous nous sommes donc penchés sur cette stratégie.

### Mesure de DO en capsule

La mesure de DO en capsule répond au besoin d'avoir une mesure de la concentration en capsule de manière non destructive, et sans avoir besoin d'ouvrir la flasque de culture.

Le principe est le même que celui expliqué précédemment : la mesure de DO repose sur la comparaison entre la lumière envoyée vers l'échantillon et la lumière collectée par le détecteur. Il ne nous était pas possible d'utiliser le montage mis au point précédemment. Dans les flasques que nous utilisons, les capsules sédimentent en une petite dizaine de secondes, et la tension mesurée sur l'unité d'acquisition varie de manière importante pendant ce laps de temps. Il est difficile de faire une mesure satisfaisante. Nous avons choisi de faire une mesure capsule par capsule, à l'aide d'un microscope.

Nous nous intéressons d'abord aux propriétés optiques des flasques de culture avec lesquelles nous travaillons. Celles ci sont présentées en figure 2.19. Nous souhaitons savoir si la flasque est de bonne qualité optique, afin d'avoir une mesure la plus précise possible.



FIGURE 2.19 – Flasque de culture 25 cm<sup>2</sup>.

Pour cela, nous mesurons la DO à travers une flasque vide en plusieurs points, et nous regardons la variabilité des valeurs obtenues. La mesure de DO se fait en comparant pixel à

## CONFIDENTIEL

pixel un cliché de mesure (avec la flasque) avec un cliché référence (sans la flasque). Le tout est exécuté grâce à un script MATLAB.

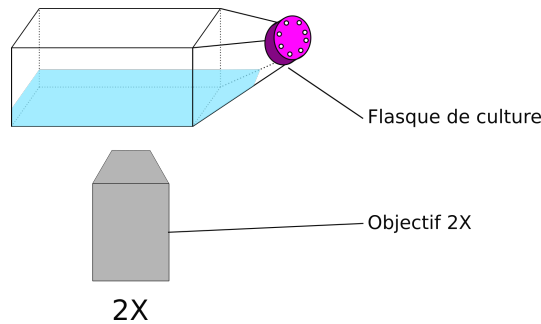


FIGURE 2.20 – Schéma du dispositif d'observation des flasques de culture.

De ces mesures, il ressort que la zone située proche du centre de la flasque a des propriétés optiques assez homogènes, ce qui n'est pas le cas des zones situées en périphérie. Les coefficients de variations des mesures de DO situées dans ces zones sont répertoriées dans le tableau 2.4.

Cette variabilité importante en périphérie provient vraisemblablement de l'inhomogénéité de l'épaisseur du polystyrène qui constitue les parois de la flasque. Utiliser ces flasques nous imposerait une zone de mesure assez restreinte, ce que nous avons jugé trop contraignant. Nous avons donc cherché une alternative à ces flasques de culture. Nous voulions privilégier une alternative commerciale afin de rester dans une optique d'industrialisation ; plutôt que fabriquer nous-mêmes ces objets.

zone	coefficient de variation (%)
centre	4,89
périphérie	68,44

TABLE 2.4 – Coefficient de variation des mesures de DO suivant la zone de mesure (centre ou périphérie de la flasque).

Nous avons trouvé un modèle de flasque (flasquette, présenté en figure 2.21) constituée d'une partie en polystyrène collé sur une lame de verre. Cet objet possède de très bonnes qualités optiques. Le résultats des mesures de DO, réalisées comme précédemment, sont reportés dans le tableau 2.5.

zone	coefficient de variation (%)
centre	0,99
périphérie	4,84

TABLE 2.5 – Coefficient de variation des mesures de DO suivant la zone de mesure (centre ou périphérie de la flasquette).

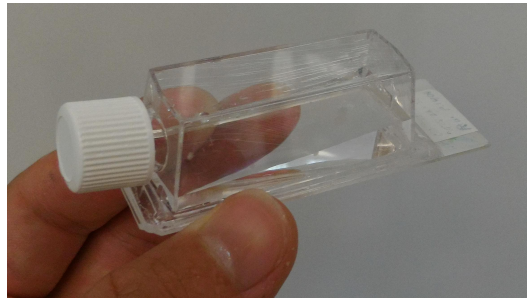


FIGURE 2.21 – Flasquette de culture.

Les propriétés optiques de cette flasquette sont suffisamment homogènes pour que nous puissions l'utiliser pour le suivi de croissance en capsule.

Ces flasquettes ont un bouchon hermétique, alors que les flasques ont un bouchon qui permet les échanges gazeux. Se pose alors la question de l'importance des échanges gazeux à travers le bouchon de la flasque, pendant la phase de croissance. Typiquement, une importante fraction du volume est occupé par de l'air (de l'ordre de 75%). Il n'est pas clair si ce volume peut être considéré comme un réservoir infini lors de la croissance, ou si au contraire il est nécessaire de permettre les échanges gazeux à travers le bouchon afin de maintenir la composition de la phase gazeuse constante.

Pour vérifier ce point, nous faisons une expérience de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en flasquette. La croissance est suivie par mesure de DO, en utilisant le montage mis au point pour la mesure de croissance en flasque. Nous présentons en figure 2.22 la courbe de croissance ainsi mesurée, sur l'axe des ordonnées est porté le logarithme de la concentration. De même que précédemment, les points forment une droite et nous pouvons faire une régression. Il est valide de comparer cette pente avec celle de la droite de régression de la figure 2.14. En effet, le passage au logarithme implique que seule une modification de l'évolution de la concentration a un impact sur la pente de la droite de régression. Le fait que la longueur du chemin optique varie n'a pas d'influence sur la pente de cette droite. La pente de la droite de régression est de  $0,026 \pm 0,011$ , et nous avons trouvé  $0,028 \pm 0,003$  à la figure 2.14. Cela n'est pas significativement différent, aussi nous sommes donc assurés que les échanges gazeux à travers le bouchon n'ont pas d'impact, ou un impact négligeable lors de la croissance des microalgues dans les flasquettes. Nous pouvons donc utiliser ces flasquettes sans problème.

CONFIDENTIEL

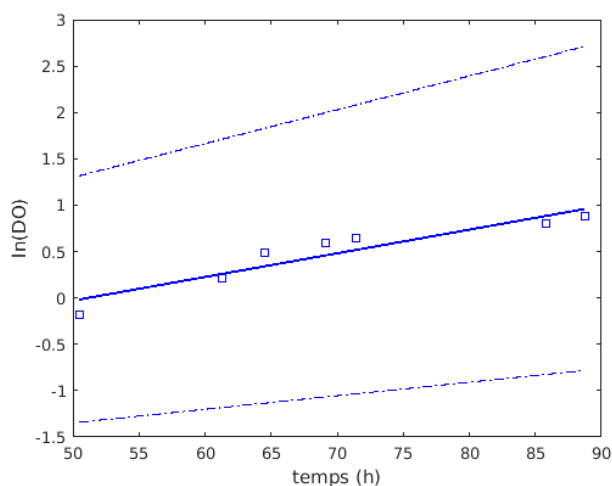


FIGURE 2.22 – Phase exponentielle WTS24- dans RCCM, flasquette. Sur l’axe des ordonnées est porté le logarithmique de la DO.

Nous nous attelons maintenant à la mesure de DO en capsule.

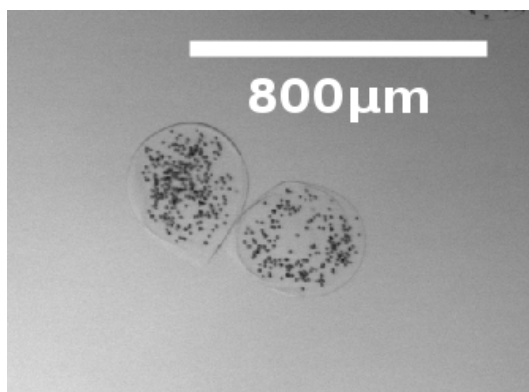


FIGURE 2.23 – *Chlamydomonas reinhardtii* encapsulées.

Des capsules contenant des microalgues sont présentées en figure 2.23. Pour mesurer la DO en capsule, il nous faut tout d’abord considérer la zone ne contenant pas la membrane d’alginate. En adaptant le script MATLAB développé pour la mesure du rayon de billes d’alginate, nous pouvons délimiter une zone de travail à l’intérieur de la capsule, comme illustré en figure 2.24. Les capsules repérées par le script sont entourées en bleu, et les zones de mesure sont délimitées par des cercles rouges.

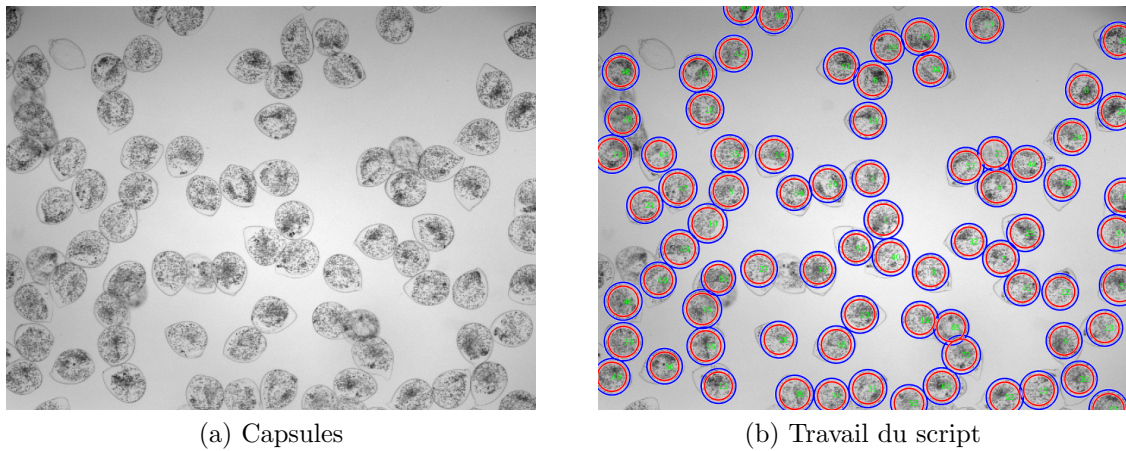


FIGURE 2.24 – Illustration du travail script.

Nous pouvons ensuite procéder au calcul de la DO pixel par pixel. Il existe une subtilité dans ce calcul : comme montré en figure 2.25, la longueur chemin optique ( $L_1$  et  $L_2$ ) n'est pas identique en tout point de la capsule. En effet, celle-ci correspond à l'épaisseur locale de la capsule. Il faut donc apporter une correction géométrique au calcul de la DO, avant de pouvoir moyenner cette DO sur l'ensemble de la zone de travail. La longueur du chemin optique de référence est fixé au diamètre de la capsule.

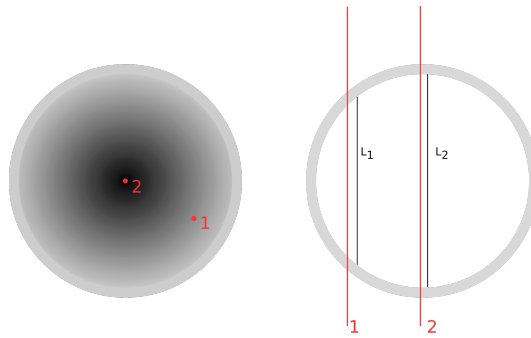


FIGURE 2.25 – Schéma longueur optique du chemin optique en différents points de la capsule, vue de haut (gauche) et depuis le côté (droit).

Les mesures à proprement parler sont réalisées en comparant deux clichés. Un cliché de référence est pris sans flasquette, puis le cliché de mesure est pris avec la flasquette contenant les capsules.

Nous avons donc mis au point un protocole de mesure pour mesurer la DO en capsule, de manière non destructive. Comme précédemment, il nous faut maintenant construire une courbe de calibration pour pouvoir relier la DO à la concentration en microalgues en capsule.

## CONFIDENTIEL

Pour ce faire, il suffit d'encapsuler une suspension de microalgues et de laisser les cellules se développer. Puis, à plusieurs moments, quelques capsules sont prélevées, la DO est mesurée. La membrane de ces capsules est ensuite dissoute et le nombre de cellules par capsule est compté au cytomètre.

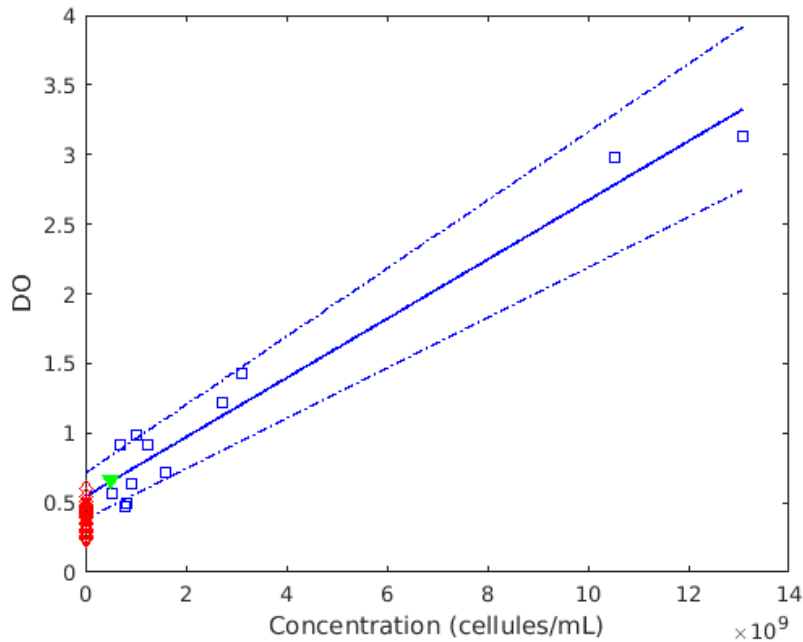


FIGURE 2.26 – Courbe de calibration DO en capsule. Le triangle vert correspond à la LOD.

Une régression linéaire donne la relation 2.7, avec un  $R^2 = 0,956$

$$DO = 2,13^{-10} * [\text{cellules}] + 0,55 \quad (2.7)$$

Il nous reste maintenant à caractériser le système, en calculant la LOD et la gamme de mesure. La LOD est calculée à partir de la mesure de la DO de capsules vides, et la concentration maximale à partir du noir de la caméra.

Les calculs donnent une LOD de 496 millions de cellules/mL en capsule. De plus, nous pouvons mesurer jusqu'à une DO en capsule de 13,2; soit des concentrations en capsule de 59,4 milliards de cellules/mL.

La LOD est un peu haute, et la seule manière que nous aurions de la rendre meilleure est de travailler sur la flasquette dans laquelle nous faisons les mesures. Il faudrait par exemple que les deux parois traversées par la lumière soient en verre optique. Or une seule l'est sur les flasquettes que nous utilisons, l'autre est en plastique.

Nous constatons une différence de pente entre les deux courbes de calibration présentées en figure 2.12 et 2.26, respectivement de  $2,90.10^{-6}$  et  $2,13.10^{-10}$ . Cette différence s'explique par trois facteurs.

Premièrement, la mesure de DO se fait dans un cas sur la largeur de la flasque (quelques centimètres), et dans l'autre sur l'épaisseur de la capsule (quelques centaines de microns). Cela contribue très significativement à la différence des pentes.

Deuxièmement, la mesure réalisée avec le montage laser montré en figure 2.10 se fait sur une plage de longueur d'onde restreinte (autour de 620-645 nm), alors que la mesure au microscope se fait sur une plage beaucoup plus large, du fait de l'absence de filtre. Or les propriétés optiques des microalgues varient en fonction de la longueur d'onde. Pour illustrer ceci, nous réalisons un spectre d'absorption d'une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii* ( $4,77 \cdot 10^6$  cellules/mL), reporté en figure 2.27). Ces différences de propriétés optiques génèrent une première différence.

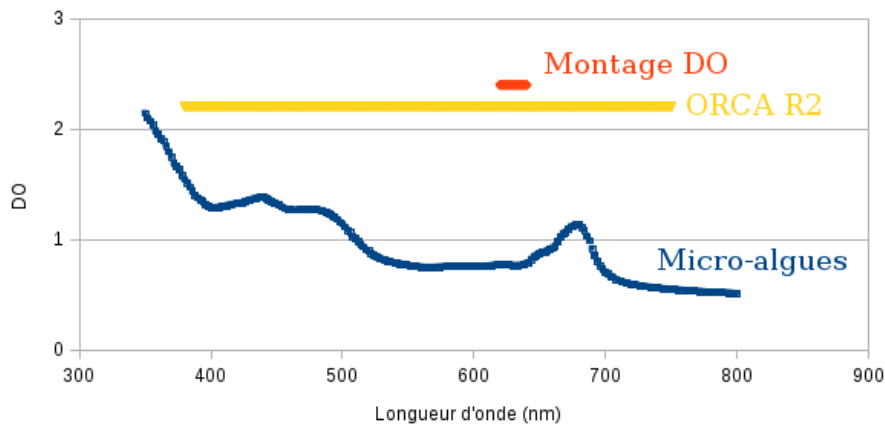


FIGURE 2.27 – En bleu, spectre d'absorbance d'une suspension de microalgues. En jaune est représenté le spectre de travail de la caméra Hamamatsu Orca R2 montée sur le microscope, en rouge le spectre de travail du montage DO.

Troisièmement, la mesure réalisée avec le montage DO est purement une mesure d'absorption, car la lumière diffusée ne revient pas dans le détecteur. Sur le microscope, les choses sont différentes car ce dernier est conçu pour récupérer une partie de la lumière diffusée. Donc la mesure physique n'est pas exactement la même.

Quoi qu'il en soit, nous étalonnons ces deux systèmes de mesure et lesdites calibrations sont de bonne qualité, donc ces différences n'impactent pas la mesure de la concentration en microalgues en suspension et en capsule.

Nous sommes maintenant capables de mesurer la concentration de microalgues en capsule, de manière précise, non destructive, et sans obligation de prélèvement dans la culture. Nous pouvons maintenant nous intéresser au suivi de croissance dans les capsules, afin de voir si l'encapsulation a un impact sur la croissance des microalgues.

### Suivi de croissance en capsule

Maintenant que nous disposons d'un outil de mesure de la concentration en algues dans les capsules, nous pouvons nous intéresser à l'impact de l'encapsulation sur la croissance des microalgues. Nous encapsulons donc une suspension de la souche WTS24- et nous la mettons en culture dans du RCCM. Quelques clichés sont présentés en figure 2.28, et la courbe de croissance est présentée en figure 2.30. Sur cette dernière figure, le logarithmique de la concentration est porté sur l'axe des ordonnées.

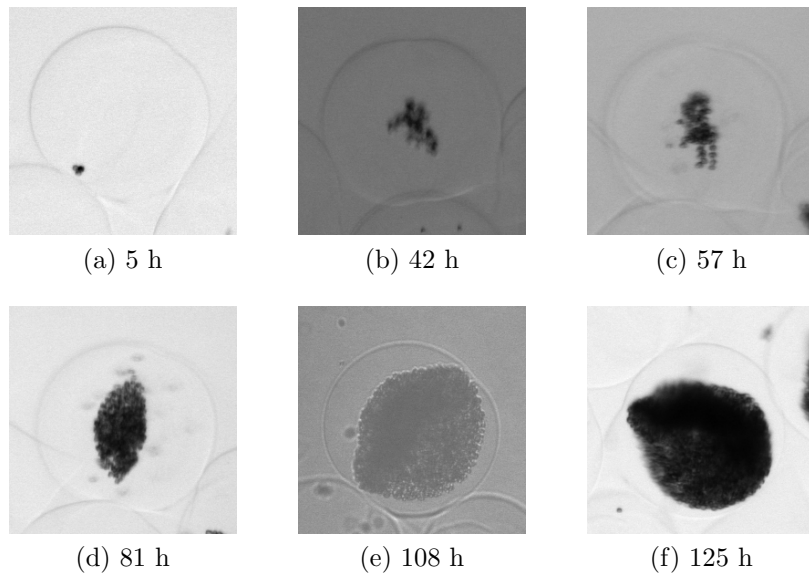


FIGURE 2.28 – Timelapse de WTS24- en capsule, dans le RCCM. Le diamètre de cette capsule est de 300  $\mu\text{m}$ .

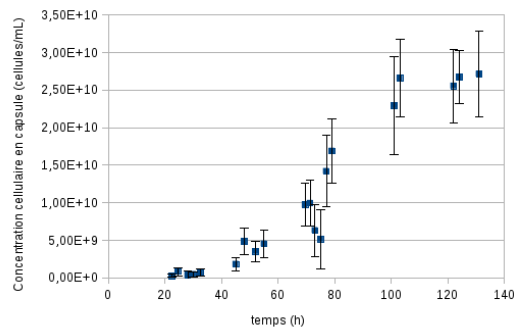


FIGURE 2.29 – Suivi de croissance de la souche WTS24- encapsulées, dans le RCCM.



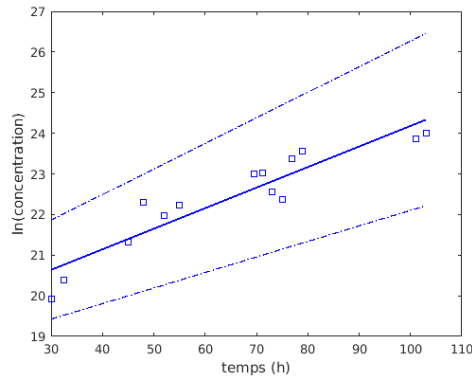


FIGURE 2.30 – Suivi de croissance de la souche WTS24- encapsulées, dans le RCCM. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration.

De même que précédemment, nous pouvons remonter au temps de division de *Chlamydomonas reinhardtii* en capsule. Nous trouvons  $13,7 \pm 3,5$  h, ce qui est 45% plus élevé qu'en suspension (cf figure 2.14). Dans ces conditions de culture, les capsules sont très diluées, typiquement une vingtaine dans 5 mL de milieu de culture. Ainsi, la concentration globale en microalgues (donnée par le rapport du nombre de microalgues encapsulées sur le volume total) est un ordre de grandeur inférieure à la concentration en microalgues dans ces conditions de culture classiques. C'est à dire que les microalgues en capsule sont dans un contexte contenant plus de nutriments et moins de déchets que si elles avaient poussé libre. Cela peut tout à fait expliquer un temps de division plus court.

Nous aurions pu investiguer cette question, en réalisant des cultures à des fractions volumiques de capsules plus élevées, ou des concentrations en nutriments plus basses. Nous avons estimé que cela sortait du cadre industriel de cette thèse, et avons préféré laisser ces questionnements de côté. L'important est que l'encapsulation n'a pas d'impact délétère sur la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ce résultat est très important. Il montre que la technologie d'encapsulation que nous utilisons n'impacte pas négativement la croissance des microalgues. Il nous permet de continuer nos investigations en étant assurés que cette méthode d'encapsulation est un bon outil, qui n'interagit pas de manière délétère avec nos micro-organismes.

Nous avons montré que nos microalgues croissent sans problème dans nos capsules. De plus, il est possible d'atteindre des concentrations très importantes en microalgues à l'intérieur des capsules.

### 2.2.3 Concentration dans les capsules

Lorsque des capsules contenant des *Chlamydomonas reinhardtii* sont incubées plusieurs jours dans un milieu riche, la concentration cellulaire dans le véhicule devient très importante. Nous allons quantifier ceci, puis nous intéresser à la fraction de cellules vivantes dans une telle structure.

## Concentration

Après plusieurs jours de culture en milieu riche, une suspension de capsules contenant des *Chlamydomonas reinhardtii* ressemble à la photo présentée en figure 2.31.

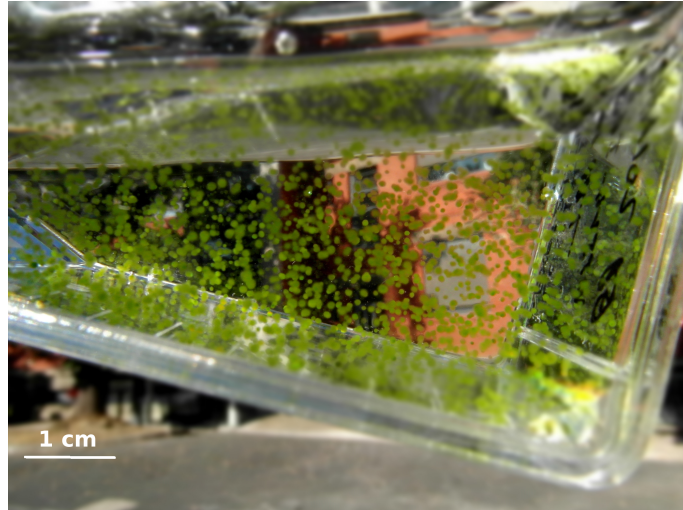


FIGURE 2.31 – Flasque de culture contenant des capsules très concentrées en microalgues.

Ces capsules semblent particulièrement concentrées en micro-algues, comme le suggère la courbe de croissance en capsule (figure 2.29) et comme le montre le cliché au microscope présenté en figure 2.32.

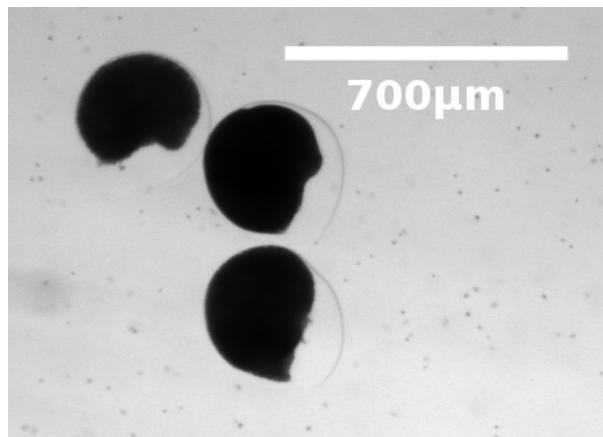


FIGURE 2.32 – Capsules contenant une très forte concentration en micro-algues, au microscope, grossissement 2X.

Nous avons tenté d'imager l'intérieur de ces capsules au microscope avec des objectifs 10x ou 20x. Nous n'avons pu voir nettement que des cellules à proximité de la membrane. De là, deux cas étaient possibles : soit les cellules sont concentrées sur la périphérie de la capsule,

laissant le cœur libre; soit les cellules forment un empilement compact dans la capsule, et le matériau diffuse trop la lumière pour qu'on puisse l'imager.

Nous avons donc décidé de faire des coupes minces de ces capsules, afin de pouvoir imager des tranches de ces structures. Nous avons utilisé le cryostat Microm HL 550 de l'UMR 8249, et fait des tranches de 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Des clichés au microscope optique sont présentés en figure 2.33. Sur ces clichés, nous distinguons nettement la membrane d'alginate entourant un amas de microalgues formant un empilement compact. Il est clair que les microalgues occupent tout l'espace de la capsule, et qu'elles sont très concentrées.

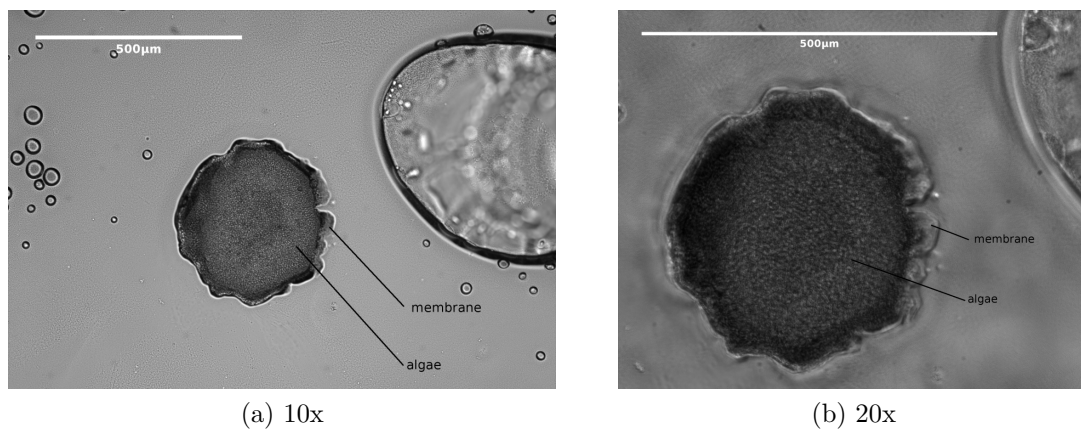


FIGURE 2.33 – Clichés en microscopie optique de coupe au cryostat de capsules contenant des microalgues concentrées au close-packing. On distingue sur les clichés la membrane d'alginate et les microalgues. La coupe fait 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

Nous avons ensuite entrepris de compter les microalgues présentes dans de telles capsules. Ceci a été réalisé grâce à un cytomètre. Connaissant les dimensions de la capsule, nous sommes capables de calculer la concentration en microalgues dans ces capsules. Celle-ci vaut  $28000 \pm 5600$  millions de cellules/mL (réalisé sur 10 capsules). Ceci est constitué un facteur 2800 par rapport à ce que l'on peut trouver dans la littérature [51].

En assimilant *Chlamydomonas reinhardtii* à une sphère de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, nous pouvons calculer la fraction volumique occupée par les microalgues dans nos capsules. Celle-ci se monte à 67%; ce qui est considérable mais cohérent avec nos observations.

Nos capsules forment un empilement aléatoire en sédimentant. Une telle structure occupe une fraction volumique de l'ordre de 64% [53]. Notre technologie d'encapsulation rend donc possible la culture de microalgues à des concentrations volumiques globales de 17 900 millions de cellules/mL, soit un facteur 1790 par rapport à la littérature.

Ceci est un apport considérable pour les bioprocédés, et ouvre des voies prometteuses pour la production de biomasse ou de molécules d'intérêt en capsule. En effet, ceci permet de réduire la surface d'une piscine de culture par un facteur 1790. Admettons que la celle-ci fasse 1 m

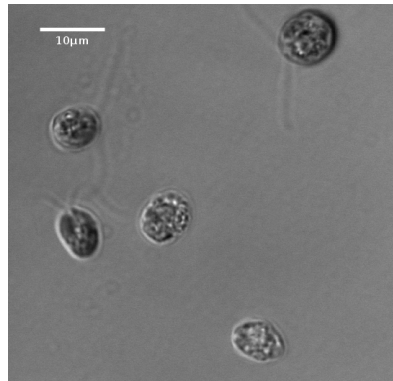
## CONFIDENTIEL

de profondeur, cela revient à passer d'une piscine de 42x42 m à une piscine d'1 m<sup>2</sup>, avec une productivité équivalente et des facilités de manipulations.

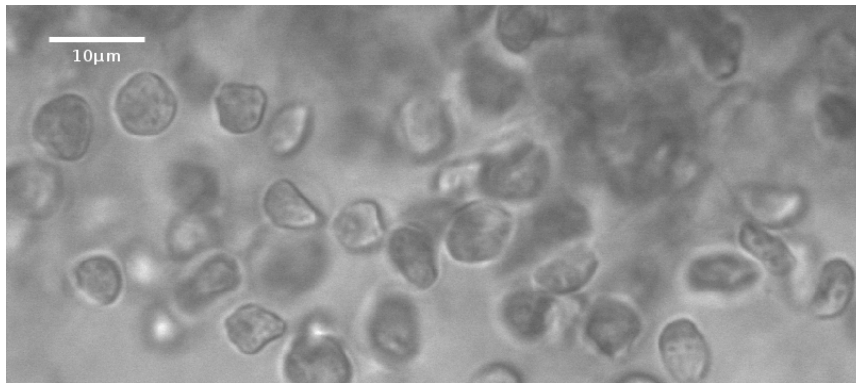
L'encapsulation offre d'autres avantages, qui seront détaillés dans la dernière section de ce chapitre.

Nous avons observé en microscopie optique des microalgues issues de capsules contenant de fortes concentrations d'algues. Ce cliché est à comparer avec un cliché de microalgues issues d'une culture classique. Le tout est présenté en figure 2.34. Nous constatons que les microalgues encapsulées présentent des formes plus anguleuses que les microalgues issues d'une culture classique.

Au vu des données précédentes, ce changement morphologique ne semble pas influencer la physiologie des microalgues. Ce point pourra être investigué dans le futur.



(a) Suspension



(b) En capsule

FIGURE 2.34 – Formes des microalgues en suspension et en bulk.

Il est légitime de se poser la question de la viabilité des cellules dans une telle structure. En effet, il est possible que les gaz, les nutriments et les déchets ne diffusent plus aussi efficacement dans la capsule que lorsque celle-ci contient des cellules formant un empilement compact. Nous nous sommes donc intéressés à la viabilité de *Chlamydomonas reinhardtii* en capsule.

## Test de viabilité en suspension

Un test de viabilité indique si la cellule est morte ou vivante. En pratique, la frontière entre les deux états est assez floue, et la définition même de la mort cellulaire pose parfois problème. Un consensus existe cependant pour dire que si la membrane plasmique d'une cellule n'est plus intacte et fonctionnelle, celle-ci peut être considérée comme morte.

Plusieurs techniques existent : comptage de colonies sur boîte, diélectrophorèse [54], tests colorimétriques [55], transformation d'un substrat non fluorescent en un produit fluorescent (fluorescéine diacétate par exemple [56]), ou encore marquage des cellules mortes par un fluorophore (DAPI ou encore SYTOX Green). Ces deux dernières méthodes requièrent soit un microscope à fluorescence, soit un cytomètre.

Typiquement, deux fluorophores sont utilisés. L'un marque les cellules vivantes (Calcéine AM, C12 rézasurine) et un autre marque les cellules mortes (DAPI, iodure de propidium). Ce dernier est exclu des cellules dont la membrane plasmique est intègre et fonctionnelle ; mais pénètre dans les cellules endommagées et vient de lier à l'ADN.

Nos microalgues sont photosynthétiques, elles émettent donc une fluorescence lorsqu'elles sont excitées dans le proche UV. Nous pouvons donc détecter toutes les cellules. Il reste à trouver un marqueur de mort cellulaire dont la zone d'excitation/émission soit différente de celle de l'autofluorescence des algues. Ceci exclut des molécules comme le DAPI. Le SYTOX Green (Thermofisher) satisfait cette exigence, et a du reste été utilisé avec succès dans le passé pour un tel test [57].

Nous réalisons un test de viabilité sur une culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en phase exponentielle, grâce à un cytomètre Partec FlowMax. Les microalgues sont diluées à une concentration de 50 000 cellules/mL, puis incubées avec du Sytox Green 1  $\mu$ M pendant 5 minutes dans l'obscurité à température ambiante. Un tel test donne une proportion de microalgues mortes de 0,56%. Ceci est cohérent avec l'idée d'une population en croissance exponentielle. Nous sommes assurés que ce chiffre n'est pas du bruit, en effet en passant un échantillon de milieu de culture seul, nous ne détectons aucune particule.

Nous avons un protocole robuste pour mesurer la fraction de cellules mortes en suspension. Nous pouvons maintenant nous intéresser à la mesure de la fraction de cellules mortes en capsule.

## Test de viabilité en capsule

Il est important de connaître la fraction de cellules mortes dans une capsule à un instant donné. D'une part, ceci permet de voir si le procédé d'encapsulation est dangereux pour les cellules, et si ces dernières restent en vie lorsqu'elles sont en capsule.

Nous pouvons faire un test similaire à celui réalisé ci-dessus. Il faut cependant ouvrir la capsule. Comme mentionné précédemment, il est possible de déstabiliser le gel d'alginate qui constitue la membrane de la capsule. Pour ce faire, il suffit d'ajouter un chélatant du calcium, comme le phosphate ou l'EDTA.

## CONFIDENTIEL

Or des travaux précédents au laboratoire ont montré que l'augmentation de la concentration en phosphate ou en EDTA dans un milieu de culture induisait une augmentation de la fraction de cellules considérée comme morte au regard d'un test de viabilité reposant sur des fluorophores. L'hypothèse formulée alors est que ces chélatants perméabilisent la paroi cellulaire, sans menacer la cellule.

Nous avons besoin cependant d'EDTA pour déstabiliser le gel d'alginate qui constitue la membrane de la capsule. C'est uniquement ainsi que nous pourrions analyser le contenu de la capsule grâce au cytomètre.

Nous réalisons donc une expérience où nous prenons une population de *Chlamydomonas reinhardtii* en phase exponentielle. Une fraction de cette population est prélevée et diluée dans du milieu Minimum auquel nous ajoutons une quantité croissante d'EDTA. L'échantillon est passé ensuite au cytomètre, pour un test de viabilité est réalisé. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2.6.

Concentration en EDTA (mM)	fraction de cellules mortes (%)
0,25	0,96%
2,5	4,53%
25	5,29%

TABLE 2.6 – Évolution de la fraction de cellules mortes avec la concentration en EDTA.

De ces données, nous déduisons que nous devons rester en dessous de 0,25 mM d'EDTA pour nos expériences. Au delà, le test de viabilité est biaisé dans des proportions trop importantes (de l'ordre d'un facteur 10).

Nous prenons des capsules contenant des algues formant un empilement compact aléatoire. Une capsule est plongée dans du milieu Minimum additionné de 0.25 mM d'EDTA. L'ensemble est agité pendant 5 minutes, puis nous procédons au marquage avec 1  $\mu$ M de SYTOX Green dans l'obscurité pendant 10 min. En parallèle, un test de viabilité d'une suspension d'algues est réalisé dans les mêmes conditions. Les résultats sont présentés en figure 2.35.

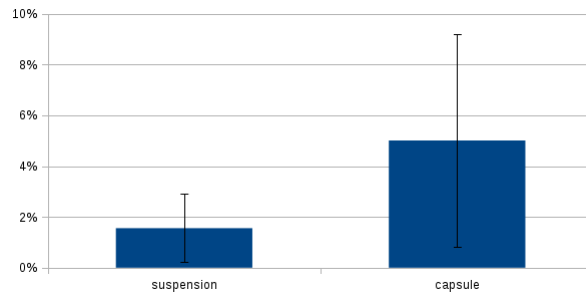


FIGURE 2.35 – Fraction de cellules mortes, en suspension (fraction volumique occupée par les microalgues à 5 millions de cellules/mL : 0,06%) et en capsule au closepacking ((fraction volumique occupée : 67%).

## CONFIDENTIEL

Les cellules contenues dans de telles capsules présentent une mortalité supérieure à celles libres en suspension, mais cela reste dans des proportions acceptables (5% et 1,5%).

La technologie que nous utilisons permet donc de cultiver *Chlamydomonas reinhardtii* à des concentrations très importantes, sans impact majeur sur la viabilité des algues.

### 2.2.4 Conclusion

Nous pouvons donc affirmer que notre système permet d'encapsuler des microalgues sans effet délétère, et de les cultiver dans ce véhicule. Il est possible d'atteindre des concentrations très importantes (3460 millions de cellules par mL dans la capsule), sans impact majeur sur la viabilité de la culture. Ces concentrations sont 180 fois supérieures à ce qui est typiquement atteint en suspension. Nous sommes capables, grâce à nos capsules, de cultiver des microalgues jusqu'à 1800 millions de cellules/mL.

Lors d'une culture en milieu riche, les cellules cultivées catabolisent un substrat carboné. Des micro-organismes contaminants peuvent aussi en profiter. Le problème des contaminations est donc réel, a fortiori si le milieu de culture n'impose pas une forte pression de sélection (culture d'extrémophiles) ou si les cellules d'intérêt ont un temps de doublement long, ce qui est le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Nous avons été confrontés à ce problème, et avons mis au point un moyen innovant de décontamination de la phase continue sans impacter le contenu des capsules.

## 2.3 Décontamination spécifique de la phase continue

Nous avons expliqué précédemment l'importance de travailler dans des conditions sans contamination. Ceci est principalement lié au temps de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*, qui est 600 fois plus long que celui d'une bactérie comme *Escherichia coli* (25 h contre 20 minutes). Cette problématique est essentiellement due au fait que nous travaillons en milieu riche. En milieu pauvre ou dans des conditions extrêmes (exemple : la culture de spiruline, qui se fait à pH 10), ces problèmes n'apparaissent pas car les contaminations ne bénéficient pas d'un environnement favorable pour se développer.

Même si nous nous efforçons de travailler le plus proprement possible, nous avons parfois des contaminations dans la phase continue. Dans une optique industrielle, il est plus simple et moins coûteux de pouvoir travailler sans avoir besoin d'une enceinte stérile. Il nous faut donc trouver des moyens d'empêcher le développement, voire de tuer les contaminations bactériennes présentes dans la phase continue. De plus, cette démarche s'inscrit dans une problématique qui se pose au delà de ce travail de thèse. Au laboratoire, les capsules sont utilisées dans le cadre de projets impliquants des cellules humaines, d'autres impliquants des bactéries. Il peut être nécessaire de faire pousser les bactéries dans les capsules et uniquement dans les capsules, comme dans le cadre des travaux de Léopold Mottet mettant en jeu un hydrogel conducteur encapsulant des bactéries électroactives.

### 2.3.1 Moyens classiques de décontamination

Les moyens de lutte contre les bactéries sont bien connus. Il convient de distinguer l'effet bactéricide (mort du germe) de l'effet bactériostatique (le germe ne peut ni grandir ni se reproduire).

Parmi les molécules qui ont des propriétés bactériostatiques ou bactéricides, on trouve : les antibiotiques (spécifiques ou large-spectre), le chlore, l'alcool à 70%, l'azoture de sodium, le thiomersal (conservateur utilisé dans des vaccins), l'argent, le formaldéhyde, l'oxyde d'éthylène.

Il existe aussi des moyens physiques de décontamination : radiations ionisantes (rayons gamma) et non ionisantes (UV), chaleur, filtration à 0,2  $\mu\text{m}$ .

Malheureusement, mis à part les antibiotiques, aucun des moyens sus-cités n'est compatible avec la culture d'algues en capsules, la plupart pour des raisons évidentes de compatibilité. En effet, il est crucial de pouvoir tuer spécifiquement les cellules à l'extérieur des capsules sans impacter le contenu des capsules.

L'utilisation de particules d'argent suffisamment grosses pour ne pas pénétrer dans la capsule est exclue, car il a été montré que l'agent cytotoxique est l'ion argent libéré par de telles particules [58]. Cet ion diffuse sans problème dans les capsules.

L'utilisation d'antibiotiques pose des problèmes environnementaux et de développement de résistances[59] ; et les prescriptions en la matière sont plutôt à la baisse de la consommation[60].

Nous avons tenté de laver les capsules pour se débarrasser des contaminations présentes dans la phase continue. Malheureusement, comme illustré en figure 2.36, il reste toujours des bactéries adsorbées sur la surface des capsules, ce qui anéantit les efforts du lavage.

Nous avons donc besoin de mettre au point une manière innovante de décontaminer la phase continue sans impacter le contenu des capsules. Enfin, le procédé doit être compatible avec les normes réglementaires en vigueur en cosmétique.



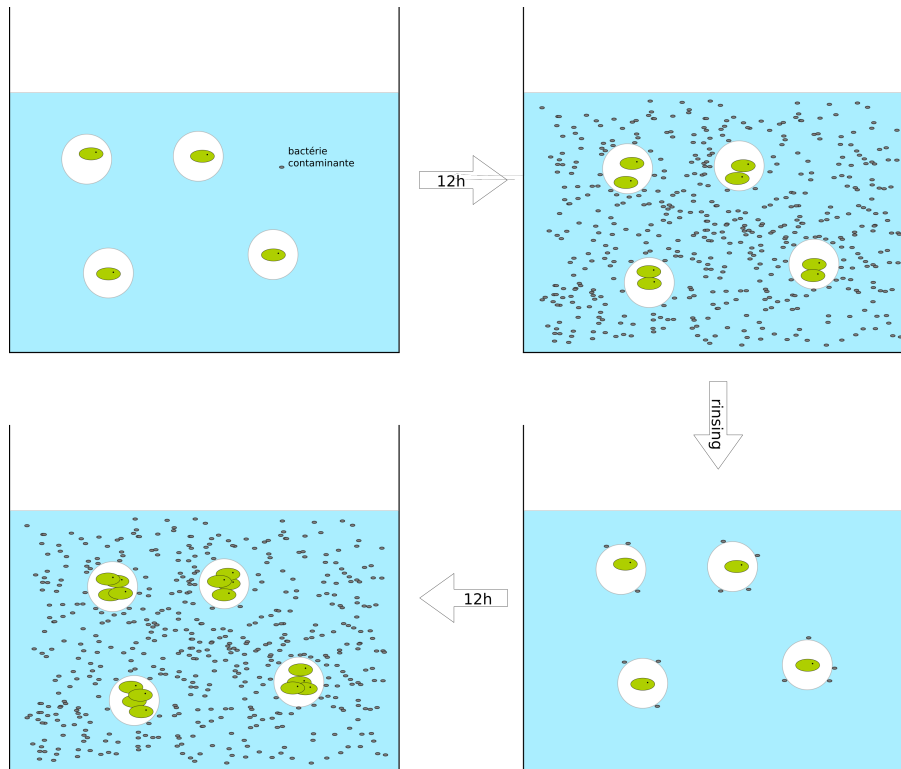


FIGURE 2.36 – Lavage infructueux de capsules incubant dans une phase continue contaminée. Une fraction des bactéries restent adsorbées sur les capsules et prolifèrent sans problème. Il est donc impossible de laver les capsules afin d’obtenir une culture sans contamination.

### 2.3.2 Utilisation de poly-L-lysine pour décontaminer spécifiquement la phase continue

La poly-L-lysine (PLL) est un homopolymère de lysine. C’est un conservateur connu de longue date [61]. Ce polymère est utilisé en alimentaire [62] [63] et en cosmétique. Le mécanisme d’action est probablement une adsorption électrostatique sur la surface du micro-organisme, ce qui induit une dégradation de la membrane et des dommages cellulaires. Ce mode d’action est différent des antibiotiques. Cette molécule est donc une bonne alternative à l’usage d’antibiotiques, dans un contexte où les résistances à ceux-ci se développent.

Nous avons eu l’intuition que ce polymère ne pourrait pénétrer dans les capsules, du fait qu’il porte de nombreuses charges positives. Ce polymère se liera de manière électrostatique à l’alginate, sans pouvoir diffuser à travers la membrane. De plus, sa conformation lui assure un rayon de giration effectif supérieur à la taille des pores de la membrane d’alginate [64]. Il peut alors exercer son influence bactériostatique dans la phase aqueuse exclusivement, comme illustré en figure 2.37.

Nous nous sommes procurés de la poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, P5899,  $M_w > 300\text{kDa}$ ). Afin d’évaluer les propriétés de la PLL et de déterminer une concentration de travail, nous avons mis

CONFIDENTIEL

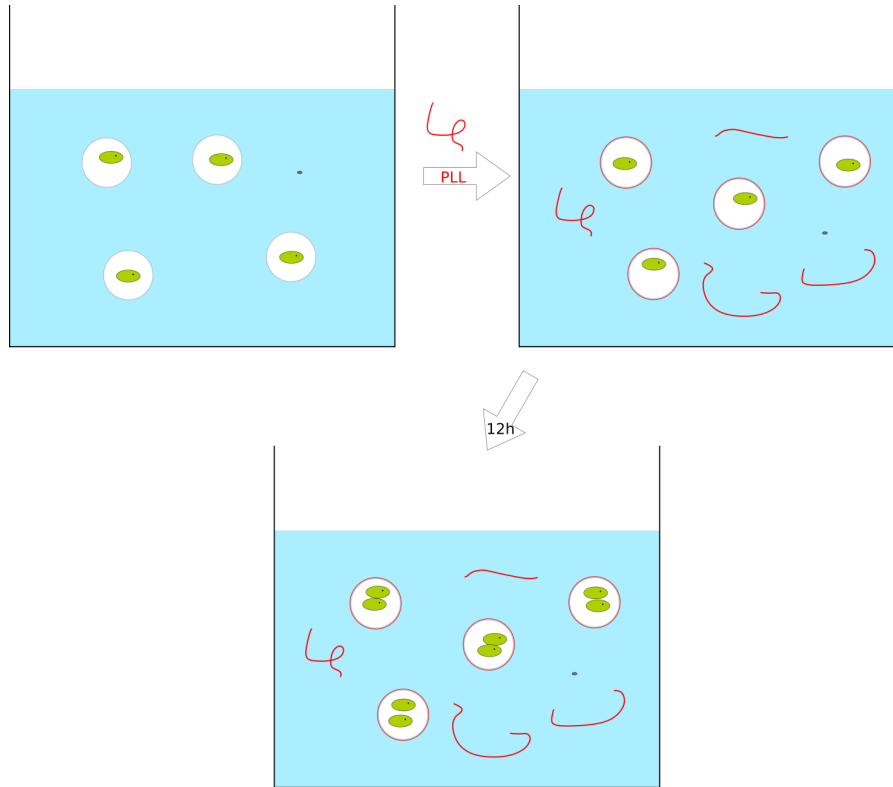


FIGURE 2.37 – Décontamination spécifique de la phase continue par l'utilisation de PLL. Les propriétés physico-chimiques de la PLL l'empêchent de pénétrer dans les capsules. La PLL exerce un effet bactériostatique dans la phase continue uniquement.

au point un protocole de challenge-test, sans utiliser de capsules. Un tel protocole sert à tester l'efficacité d'un bactériostatique ou d'un bactéricide. Dans trois flasques de culture contenant 10 mL de RCCM, nous ajoutons respectivement 0,  $10^{-4}\%$  et  $10^{-3}\%$  de PLL. Une quatrième flasque est préparée, elle contient 10 mL de RCCM additionné d'ampicilline à la concentration de travail (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Puis, 1  $\mu\text{L}$  d'une suspension de *E. coli* YFP. Grâce à une mesure de DO, nous connaissons la concentration en bactéries. Nous calculons que nous introduisons 10000 bactéries. Ce nombre est fixé arbitrairement, et nous semble raisonnable quant aux nombres de bactéries. Comme précédemment, le développement des bactéries induira une turbidité du milieu de culture.

Le tout est mis à l'incubateur pendant une semaine. Après quoi, les flasques sont observées, cf figure 2.38. Nous constatons que des bactéries se développent dans la flasque contrôle ainsi que dans la flasque contenant  $10^{-4}\%$  de PLL. Il n'y a pas de croissance dans la flasque contenant de l'ampicilline, ni dans celle contenant  $10^{-3}\%$  de PLL. Cette image illustre l'effet bactériostatique de la PLL.

Cet effet impacte aussi *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans les mêmes conditions, on constate que les microalgues se développent dans une flasque contenant  $10^{-4}\%$  de PLL, mais pas dans celle en contenant 10 fois plus, comme montré en figure 2.39. Il est donc crucial que ce polymère

CONFIDENTIEL

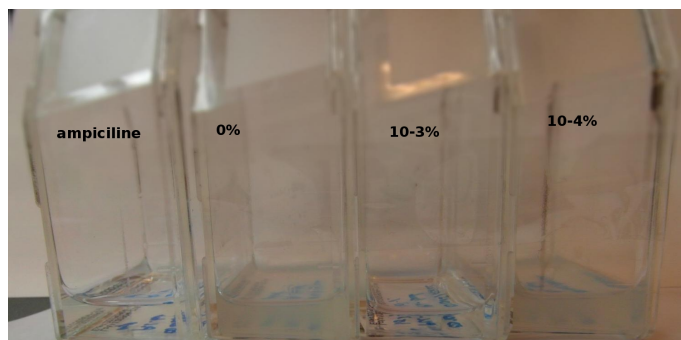


FIGURE 2.38 – Flasques contenant du RCCM et un inoculum de *10000 E.coli* et, de gauche à droite,  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-4}\%$  et 0% (contrôle) de PLL P5899 ; après 1 semaine à l'incubateur. Les bactéries se sont développées dans les flasques contenant 0 et  $10^{-4}\%$  de PLL, pas dans celle contenant  $10^{-3}\%$  de PLL ni dans celle contenant de l'ampiciline.

ne pénètre pas dans les capsules.

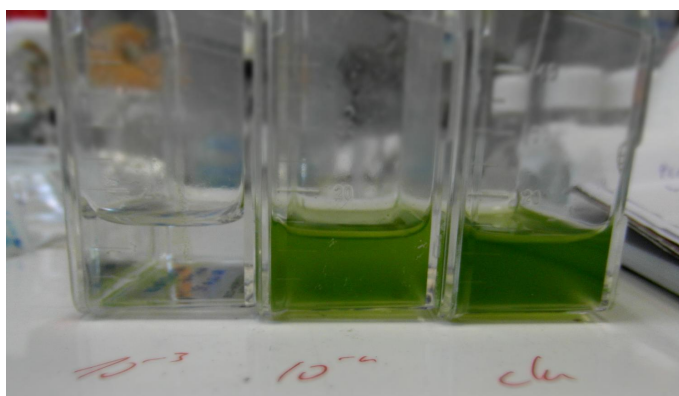


FIGURE 2.39 – Flasques contenant du RCCM et des *Chlamydomonas reinhardtii*, et de gauche à droite  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-4}\%$  et 0% (contrôle) de PLL. Les microalgues se développent dans les flasques contenant 0 et  $10^{-4}\%$ , mais pas dans celle contenant  $10^{-3}\%$  de PLL.

## CONFIDENTIEL

Il nous reste ensuite à valider que l'ajout de PLL n'interfère pas avec la culture d'algues en capsule. Pour ce faire, nous fabriquons des capsules puis nous les mettons en culture dans du RCCM additionné de  $10^{-3}$  % de PLL. Les cellules croissent sans problème dans ce milieu, comme le montre la figure 2.40. Nous traçons aussi le log de la DO en fonction du temps en figure 2.41, afin d'obtenir la pente de la droite de régression.

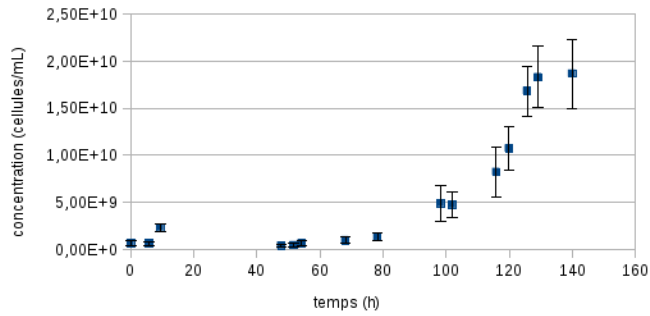


FIGURE 2.40 – Courbe de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* WTS24- en capsule, dans du RCCM additionné de  $10^{-3}$  % de PLL.

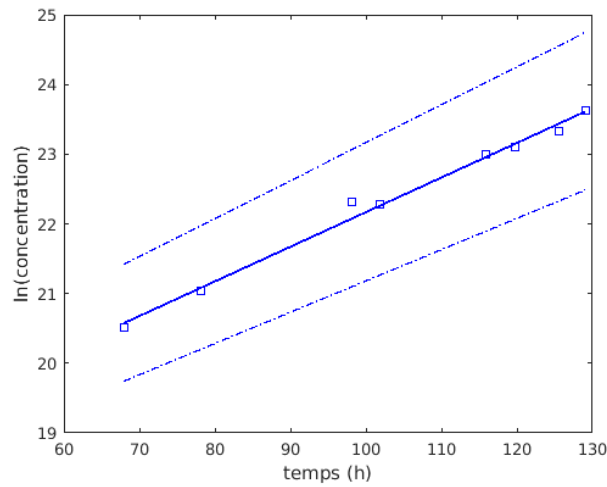


FIGURE 2.41 – Courbe de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* WTS24- en capsule, dans du RCCM additionné de  $10^{-3}$  % de PLL. Sur l'axe des ordonnées est porté le logarithmique de la concentration.

Nous pouvons calculer le temps de division des microalgues dans ce contexte. Ce temps vaut  $13,9 \pm 1,4$  h. Ce temps n'est pas significativement différent de celui obtenu pour des microalgues dans du RCCM sans PLL (cf figure 2.30). La présence de PLL n'a donc aucun impact délétère sur la croissance des microalgues en capsule.

### 2.3.3 Conclusion

Nous avons élaboré un moyen innovant de décontaminer exclusivement la phase continue dans laquelle baigne les capsules, sans impacter le contenu de celles-ci. Ce procédé met en jeu un polymère bactériostatique, compatible cosmétique et alimentaire. Il permet de compléter voire remplacer l'utilisation classique d'antibiotiques. Il fait l'objet d'une demande de brevet.

Ce procédé ouvre aussi la possibilité de faire une première en cosmétique : un produit contenant des microalgues vivantes en capsule.

## 2.4 Apport des capsules pour la production de lipides et pour les bio-procédés en général

Nous allons maintenant utiliser les capsules dans le cadre d'une induction de la production de lipides, puis nous expliciterons les apports des capsules pour les bio-procédés en général. Certaines souches de microalgues sont connues pour accumuler les lipides lorsqu'elles sont soumises à une carence en azote. C'est le cas de la souche Sta6CW15 chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous nous sommes intéressés à la quantification de l'expression de ces lipides, et à l'apport de notre technologie d'encapsulation pour ce procédé.

### 2.4.1 Sécrétion de lipides en suspension

#### Pertinence de la bio-production de lipides

En cosmétique, les développements produits sont très guidés par l'histoire qui va être racontée à travers eux, et l'univers qui va être exploré. Ces univers suivent des tendances. Parmi les tendances à la hausse, on peut citer les « actifs biosourcés », les « microalgues », les « ingrédients d'origine marine ». Certaines marques comme Daniel Jouvance en ont fait leur image de marque (« expertise cosmétique marine »). D'autre part, les lipides ont toujours été porteurs en cosmétique, pour leurs effets supposés et avérés comme agents antibactériens, actifs dans des produits de soin ou encore actifs anti-âge [65] [6] [29] [66].

On conçoit donc aisément que vendre un produit contenant des lipides sécrétés par des microalgues puisse intéresser fortement le marketing cosmétique.

La dernière décennie a vu l'émergence et le développement de la nutraceutique. La nutraceutique, synonyme d'alicament ou encore d'aliment fonctionnel, fait référence à l'ingrédient actif présent à l'état naturel dans un aliment qui procure un effet bénéfique pour la santé.

## CONFIDENTIEL

Les microalgues sont utilisées pour cette application, principalement du fait de leur teneur élevée en protéines, vitamines, et dans certains cas lipides (acides gras oméga-3) [24]. Pour illustrer cette tendance, nous pouvons citer les compléments alimentaires à base de microalgues (principalement Spiruline et Chlorelle); les efforts d'une entreprise comme Fermentalg pour la production à grande échelle d'oméga-3[67]; ou encore le développement par Algama de Springwave, une boisson « naturellement régénérante à base de spiruline ».

La sécrétion de lipides par des microalgues est donc tout à fait pertinente pour une application en cosmétique ou alimentaire. De plus, c'est un modèle simple et bien documenté dans la littérature. Il fait donc un exemple idéal pour l'application de notre technologie aux bio-procédés.

De manière plus large, la bio-production de lipides par des microalgues intéresse aussi le secteur des bio-carburants. Des microalgues ont été identifiées comme de bons organismes pour produire des lipides [25]. Le biodiesel issu de la culture de microalgues est plus viable que le bioethanol issu de l'exploitation des déchets végétaux [68].

Des procédures de criblage de ces microalgues ont été mises au point [69]. Des exemples de production industrielle sont disponibles dans la littérature [70], et plusieurs dizaines, voire centaines de structures industrielles existent, de la PME (Algosource, Algenol, Seambiotic) au département de multinationale (Chevron, Shell), et certains projets sont poussés par de grands industriels comme Airbus.

Ces développements se font cependant avec des contraintes différentes de celles engagés pour la cosmétique et l'alimentaire. Les contraintes de coûts sont effet bien plus drastique dans le domaine de biocarburants que dans celui de la cosmétique. Cela conduit à des approches différentes, qui privilégient par exemple les cultures autotrophes aux cultures hétérotrophes.

### **Induction de la production de lipides**

Pour induire la production de lipides chez Sta6CW15, il est nécessaire de changer le milieu de culture, pour cultiver les cellules dans un milieu sans azote. Pour ce faire, les microalgues sont centrifugées (typiquement 500 g pendant 10 min), le surnageant est remplacé par un milieu nommé N0 (riche, sans azote). La procédure est répétée deux voire trois fois.

L'accumulation des lipides sous forme de gouttelettes lipidiques se fait typiquement en une centaine d'heures. Nous nous sommes penchés sur une méthode de quantification des lipides.

### **Mise au point d'une méthode de suivi de l'accumulation de lipides par une suspension de microalgues**

Classiquement, la quantification des lipides produits par une suspension de microalgues se fait par des méthodes chromatographiques [71] [69] ou avec un cytomètre et des fluorophores comme le Nile Red [72] ou le BODIPY [73].

Nous souhaitons développer une méthode de mesure qui soit adaptée à la mesure de la quantité de lipides chez les microalgues en suspension et encapsulées. Nous pourrions déstabiliser

## CONFIDENTIEL

la membrane de la capsule et passer le contenu au cytomètre, mais l'objectif fixé était de mettre au point une mesure réalisable en capsule.

Nous nous sommes portés sur une mesure par fluorescence avec du Nile Red. Nous avons étudié dans un premier temps l'opportunité de réaliser cette mesure avec le lecteur de plaque TECAN M200 Pro. Malheureusement, nous n'avons pas assez de signal pour réaliser cette mesure correctement. En effet, le signal de fluorescence du Nile Red est dilué dans le volume, et nous ne parvenons pas à faire de mesure significative.

Nous avons donc opté pour une méthode par microscopie à fluorescence. Un petit volume de suspension de microalgues est prélevé, marqué puis observé au microscope, des clichés au 20X et 100X sont enregistrés. Cela est répété à une à deux fois par jours pendant une semaine. Un simple script MATLAB permet de sélectionner les pixels faisant partie d'une algue, puis de compter la fraction de pixels du canal correspondant à la fluorescence du Nile Red et dont l'intensité est supérieure à un seuil arbitrairement fixé. Ce seuil est fixé en prenant le maximum de la fluorescence d'une cellule Sta6CW15 qui évolue dans un milieu contenant de l'azote.

Une culture de Sta6CW15 dans du RCCM en phase exponentielle est scindée en deux. Puis une partie est re-suspendu dans du RCCM, une autre est centrifugée (500 g pendant 10 min) et le milieu de culture est remplacé par du milieu N0CCM. L'accumulation de lipides est suivie à partir de ce moment. Les données sont présentées en figure 2.42.

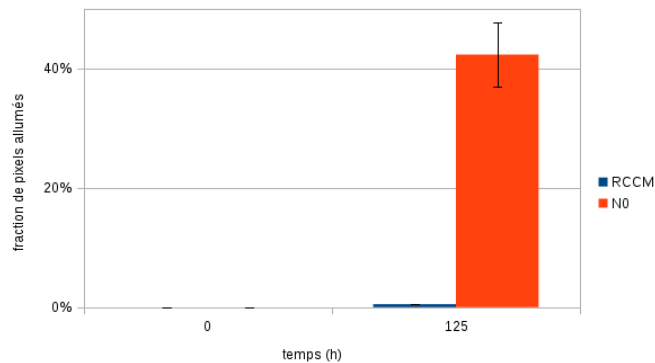


FIGURE 2.42 – Suivi de l'accumulation de lipides par Sta6CW15, en présence (RCCM) et en absence (N0) d'azote.

Nous constatons que les microalgues accumulent bien des lipides une centaines d'heures après le début de la carence en azote. La différence entre la carence et la présence d'azote dans le milieu de culture est très importante (facteur 50 entre la fraction de pixels avec et sans carence en azote).

## CONFIDENTIEL

Des clichés de microalgues ayant accumulés des lipides sont présentés en figure 2.43.

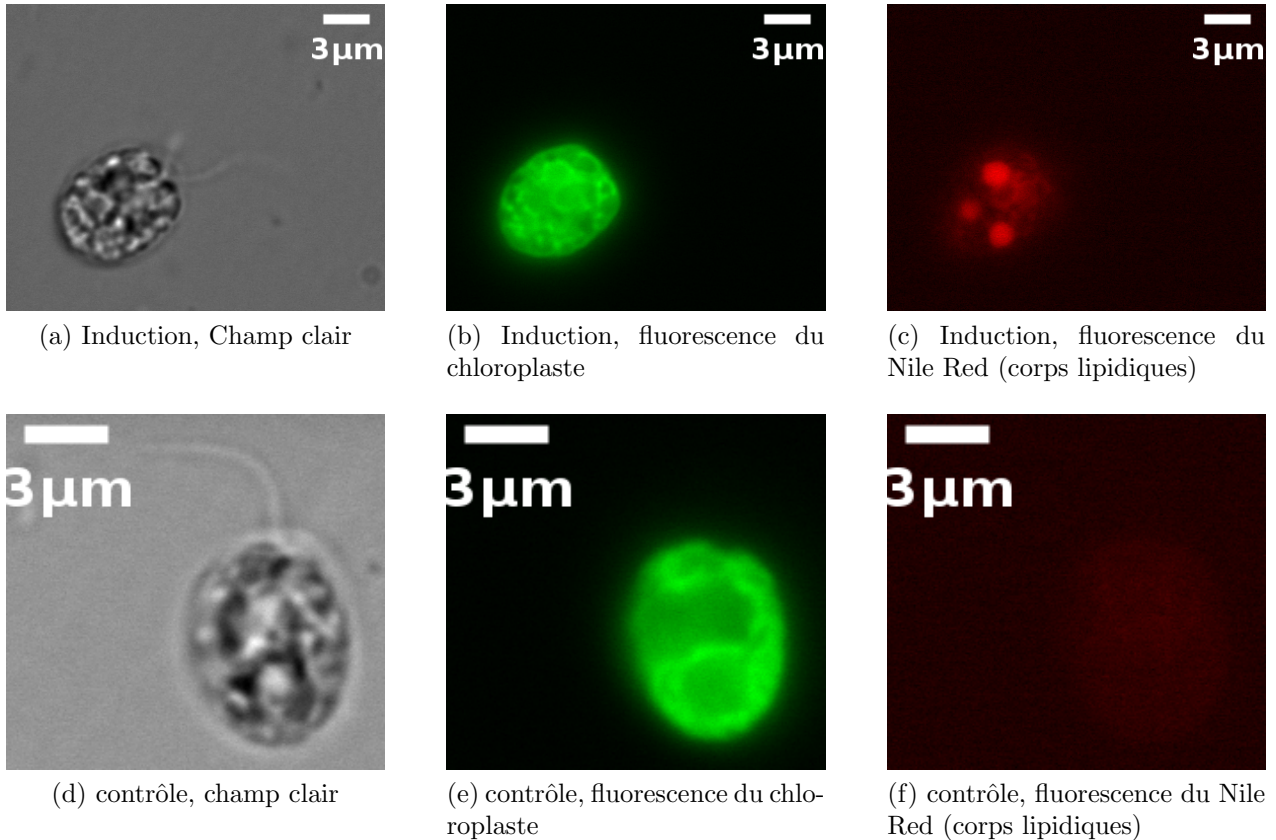


FIGURE 2.43 – Accumulation de lipides dans des corps lipidiques en carence d’azote. Les corps lipidiques ressortent clairement sur le cliché c. Les clichés de la première ligne correspondent à une microalgue qui a subi une carence en azote, les clichés de la deuxième ligne au contrôle. Sur chaque ligne est présenté, dans l’ordre, le canal champs clair, le canal UV (fluorescence du chloroplaste) et le canal TRITC (fluorescence du marqueur lipidique Nile Red).

La méthode de suivi de la production de lipides par des microalgues étant au point. Nous pouvons maintenant passer au suivi de l’accumulation de lipides par des *Chlamydomonas reinhardtii* Sta6CW15 en capsule, et montrer les apports de l’encapsulation pour ce procédé.

### 2.4.2 Production de lipides par des microalgues encapsulées

Nous allons maintenant nous intéresser au suivi de la production de lipides par des microalgues encapsulées.

Nous commençons par valider que le protocole de marquage fonctionne bien dans les capsules. Pour ce faire, nous encapsulons une huile minérale cosmétique, la Parol (Sonneborn). Nous



procédons ensuite au marquage de ces capsules, et nous comparons les niveaux de fluorescence avec ceux de capsules non marquées. Les résultats sont présentés en figure 2.44

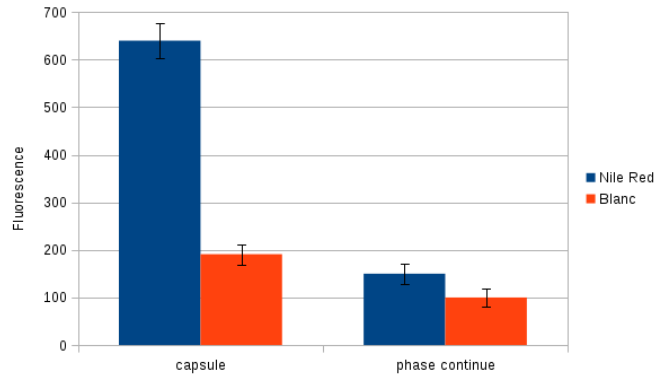


FIGURE 2.44 – Validation du protocole de marquage de lipides avec du Nile Red. Les capsules contiennent de la parol, une huile minérale cosmétique.

Le niveau de fluorescence est élevé (600) dans les capsules marquées par le Nile Red, et sort clairement du signal de la phase continue (150 avec Nile Red, 100 sans). La Parol présente un faible autofluorescence (190). Ceci nous indique que le fluorophore diffuse sans problème à travers la membrane d'alginate. Nous pouvons donc utiliser le Nile Red pour marquer les lipides contenus dans des microalgues encapsulées.

Une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii* Sta6CW15 dans du RCCM est encapsulée, puis laissée 72 heures à croître dans du RCCM, dans plusieurs flasques. Ensuite, une flasque est choisie. Le milieu contenu dans celle-ci est remplacé par du N0CCM. Ceci est rendu très simple par la sédimentation rapide des capsules.

Au bout de 120 heures, plusieurs capsules sont prélevées et marquées avec du Nile Red. Les résultats sont présentés en figure 2.45. Des clichés de capsules provenant de la flasque carencée en azote sont présentés en figure 2.46.

Nous observons bien une accumulation de lipides par les microalgues encapsulées. Il n'y a pas de différence significative entre la fraction de lipides accumulés en bulk ou en capsule. Cependant, la méthode de caractérisation en capsule n'est pas aussi précise qu'en suspension (erreur de 30%), aussi il est aventureux de faire une conclusion quantitative. Nous pouvons néanmoins affirmer sans problème que la fonction de production de lipides en carence d'azote est préservée chez Sta6CW15.

Des méthodes quantitatives de détection de lipides existent [74]. Nous pourrions ainsi comparer correctement les quantités de lipides produites par des microalgues en suspension et encapsulées. Nous n'avons cependant pas jugé pertinent de nous lancer dans cette voie, notre objectif était en effet de montrer les avantages des capsules pour les bioprocédés en apportant des preuves de concept, et il a été atteint. Si nous avions eu un partenaire industriel intéressé par la bioproduction de lipides en capsule, nous aurions alloué les ressources nécessaires pour faire cette quantification de manière fine.

## CONFIDENTIEL

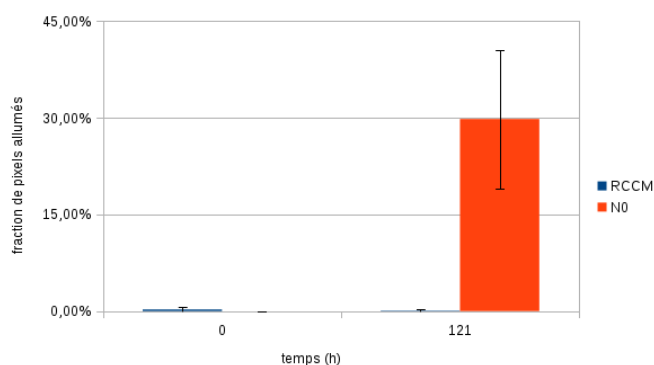


FIGURE 2.45 – Suivi de l'accumulation de lipides dans les microalgues encapsulées, grâce à un marquage au Nile Red.

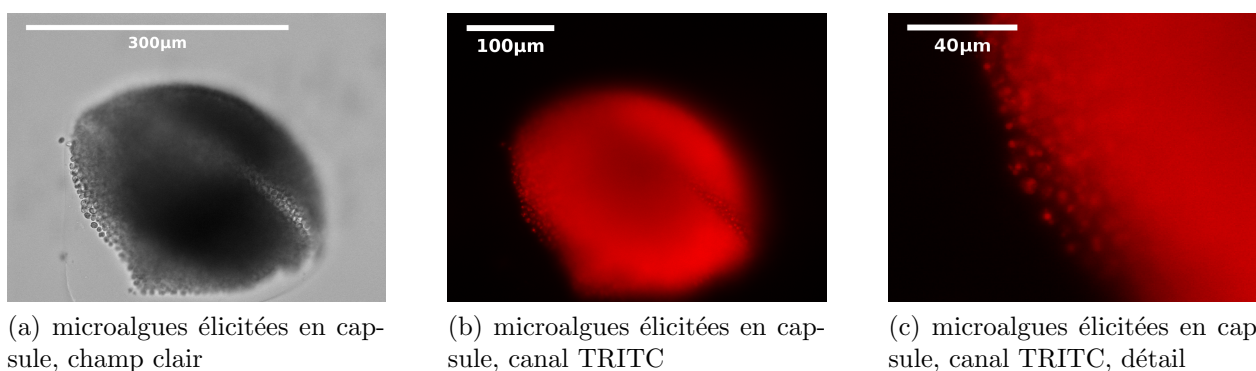


FIGURE 2.46 – Accumulation de lipides chez des microalgues élicitées en capsule. On distingue bien les corps lipidiques sur le cliché de droite.

Nous avons montré que l'encapsulation conserve la fonction de bioproduction de lipides par la souche Sta6CW15. Comme vu précédemment, l'encapsulation permet d'atteindre des concentrations très élevées en capsules et a ainsi un intérêt industriel certain dans le contexte d'une production de molécules d'intérêt. L'encapsulation apporte d'autres avantages que nous allons maintenant détailler.

### 2.4.3 Simplification des bio-procédés grâce aux capsules

#### Manipulation des cellules encapsulées

Les capsules permettent de simplifier la manipulation des cellules utilisées dans les bio-procédés. En effet, la taille des objets manipulés passe de quelques microns à quelques centaines de microns. Ainsi, un simple tamis cellulaire muni d'une grille 100 µm suffit pour récolter les capsules, les laver et les disposer dans une flasque de culture. De même, une micro-pipette suffit à manipuler une capsule unique.

## CONFIDENTIEL

Des efforts sont faits actuellement au laboratoire pour mettre au point une technologie millifluidique permettant la manipulation de capsules individuelles. Un des objectifs est de pouvoir en dispenser un nombre déterminé dans une plaque 96 puits. Ceci permet de coupler la technologie d'encapsulation avec des techniques d'analyse classiques. Cela ouvre des voies prometteuses en terme de criblage d'organismes et de conditions de culture.

Cet avantage paraît négligeable en soit, mais c'est en réalité un apport remarquable : il simplifie la manipulation au quotidien, permet de s'affranchir de matériel, et ouvre des perspectives scientifiques et industrielles. Il est par exemple possible d'encapsuler des cellules, de disposer les capsules au sein d'une matrice complexe comme un sol, puis de pouvoir les récupérer et d'analyser leur contenu.

### **Renouvellement ou changement de milieu de culture, rinçage**

La taille des capsules leur confère une vitesse de sédimentation plus grande que les cellules libres. Considérons la vitesse de sédimentation, dont la formule est donnée par l'équation 2.8, où  $r$  est le rayon de la particule considérée,  $g$  l'accélération de la pesanteur,  $\Delta\rho$  la différence de densité entre la particule et le solvant, et  $\eta$  la viscosité dynamique.

$$V_s = \frac{2r^2g\Delta\rho}{9\eta} \quad (2.8)$$

Entre une cellule libre et une capsule, la seule variable qui change très significativement est le rayon. Le rayon d'une cellule est de l'ordre du micromètre, celui d'une capsule de l'ordre de la centaine de micromètre. Ainsi, la vitesse de sédimentation est 4 ordres de grandeur plus grande que celle d'une microalgue. Cela simplifie considérablement les renouvellements ou les changements de milieux. Comme montré en figure 2.47, les capsules sédimentent en moins de 3 minutes dans nos flasques, à une vitesse de 1,5 cm/min. Des capsules vides sédimentent trois fois moins vite, donc la contribution du terme en  $\Delta\rho$  est faible devant la contribution du terme en  $r^2$ .

CONFIDENTIEL

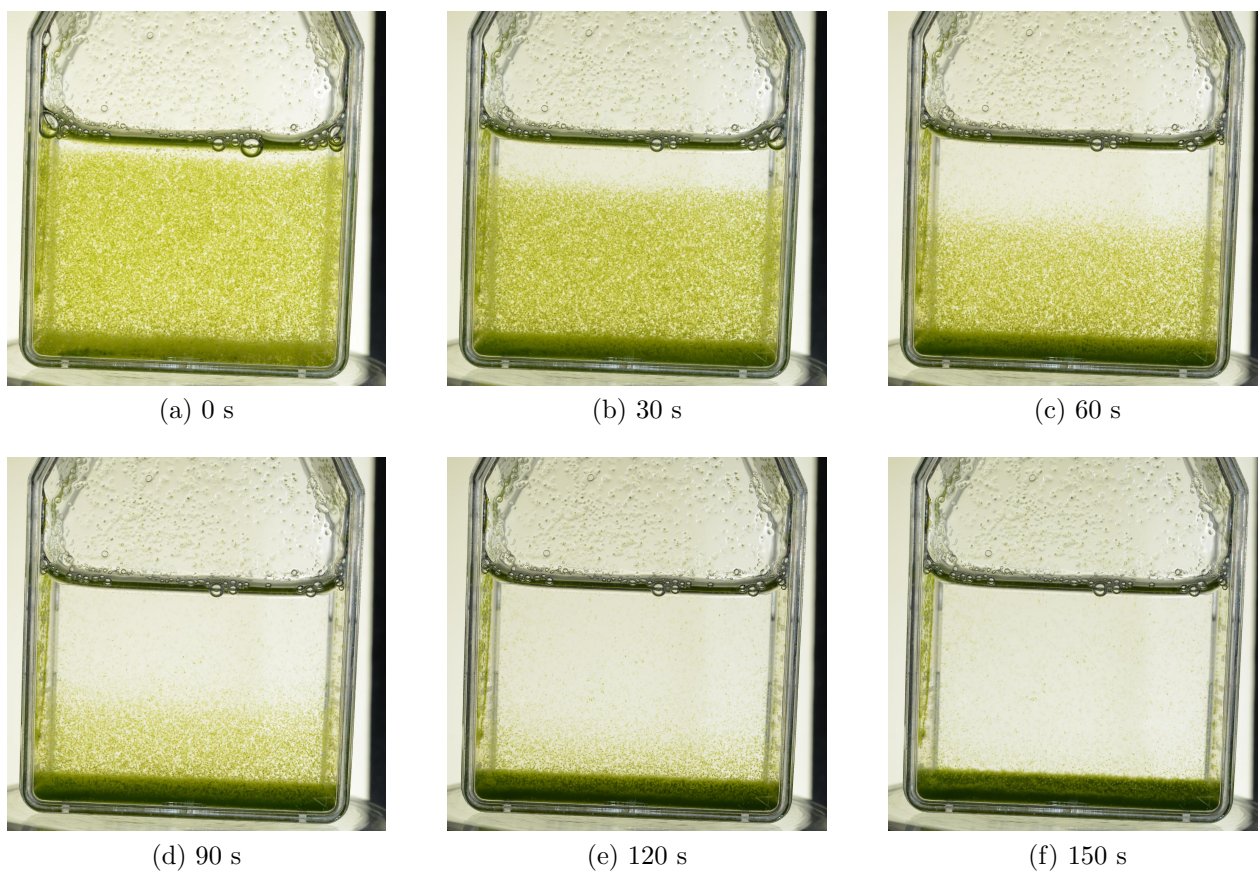


FIGURE 2.47 – Sédimentation de capsules contenant des microalgues. En moins de trois minutes, la suspension a sédimenté.

Or une suspension de microalgues ne sédimente pas en 3 minutes, comme montré en figure 2.48. Les changements de milieu et les rinçages sont des étapes très importantes en culture cellulaire. Or pour réaliser cela, il faut typiquement centrifuger les cellules, ce qui apporte des contraintes de manipulation, de coût, éventuellement de volume. C'est enfin une opération que des cellules fragiles, comme les cellules-souches de mammifères, supportent mal. La technologie d'encapsulation apporte ici une valeur ajoutée remarquable, tant en terme de facilitation de procédés (rinçage ou changements de milieux) que d'ouverture de perspectives.

Les capsules d'alginate possèdent d'autres avantages, principalement liés à la membrane d'alginate.

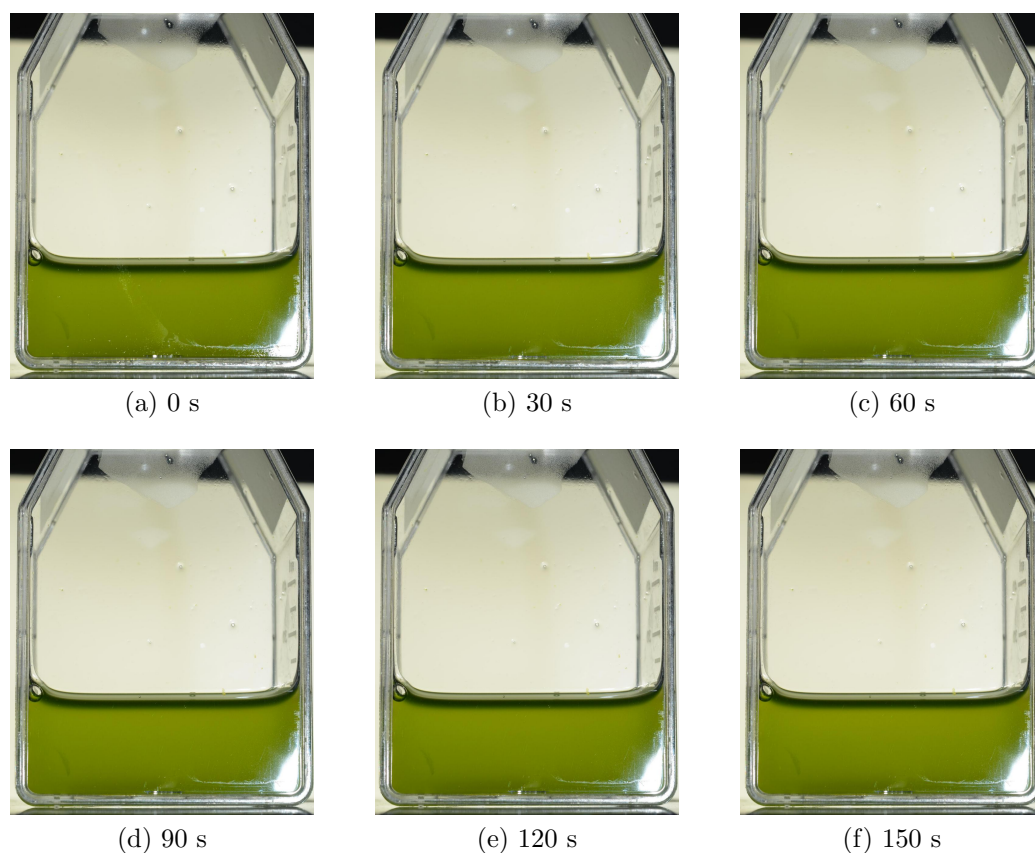


FIGURE 2.48 – Sédimentation de microalgues. Aucune sédimentation n'est visible.

### Apports de la membrane semi perméable : cellules planctoniques et non adhérentes, cocultures, protection, nutrition et fouling

Comme nous l'avons montré précédemment, l'encapsulation permet de cultiver facilement et à des concentrations très importantes des microalgues. Ceci peut s'étendre sans problème à la culture d'autres cellules planctoniques, mais aussi à des bactéries ou encore à des cellules non adhérentes, telles que les cellules souches hématopoïétiques. Il y a là un domaine à très haute valeur ajoutée où les capsules peuvent avoir un impact fort.

La membrane d'alginate qui constitue la coque de nos capsules est semi-perméable. Ceci permet de laisser diffuser de petites molécules mais de stopper les gros polymères et les cellules. Cela permet d'isoler les cellules encapsulées de contaminations extérieures, et de conserver par exemple une population monoclonale.

Il est aussi possible de faire croître deux populations symbiotiques tout en gardant celles ci séparées physiquement l'une de l'autre. Hosoda *et al.* [75] ont mis au point une association symbiotique de deux mutants d'*Escherichia coli*. L'un, I<sup>-</sup> est auxotrophe pour l'isoleucine; l'autre, L<sup>-</sup>, est auxotrophe pour la leucine. Ainsi, chaque population est auxotrophe pour un acide aminé essentiel synthétisé par l'autre mutant.



## CONFIDENTIEL

Léopold Mottet a encapsulé le mutant  $L^-$  et l'a mis en culture dans un milieu contenant une population de mutant  $I^-$ , comme illustré dans le paragraphe 2.49.

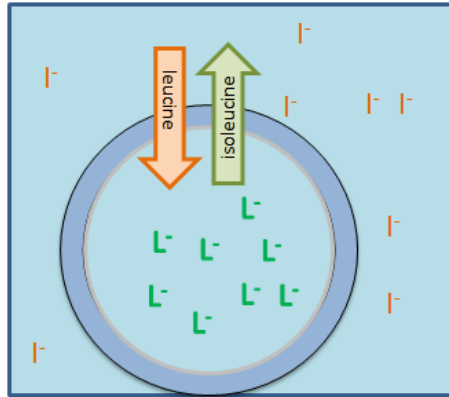


FIGURE 2.49 – Schéma de la culture de deux mutants d'*Escherichia coli*,  $I^-$  et  $L^-$ , qui sont en mutualisme obligatoire. La population de  $L^-$ , auxotrophe pour la leucine, est physiquement séparée de la population de  $I^-$ , auxotrophe pour l'isoleucine, par la membrane de la capsule.

Ainsi, les deux mutants s'échangent les acides aminés à travers la membrane d'alginate. Cette culture se fait sans problème, comme montré dans la figure 2.50.

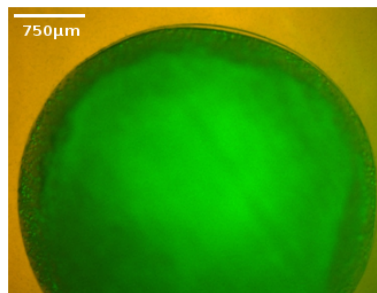


FIGURE 2.50 – Image (microscope à fluorescence) de la culture deux mutants d'*Escherichia coli*,  $I^-$  et  $L^-$ , qui sont en mutualisme obligatoire. La population de  $L^-$ , auxotrophe pour la leucine, émet une fluorescence verte; la population de  $I^-$ , auxotrophe pour l'isoleucine, émet elle une fluorescence orange.

Les cellules de mammifères sont largement utilisées pour la bio-production de protéines thérapeutiques, de vaccins et d'antibiotiques monoclonaux [76] [77]. La culture à forte densité et haut rendement de ces cellules posent des problèmes de procédé, liés d'une part à la problématique du mélange [78], et de l'autre à l'apport de nutriments et d'oxygène.

Mélanger de manière homogène implique d'apporter une contrainte de cisaillement sur les cellules, ce qui a un effet délétère. La membrane de nos capsules est suffisamment robuste pour pouvoir résister à une agitation importante sans souffrir de dommages. Nous démontrons ceci en mettant des capsules dans un flacon muni d'un barreau aimanté. Le tout est placé sur un

agitateur magnétique et agité pendant 14 heures à 100 rpm, ce qui est suffisant pour suspendre les capsules. Des clichés de capsules avant et après agitation sont présentés en figure 2.51. Les capsules restent intactes.

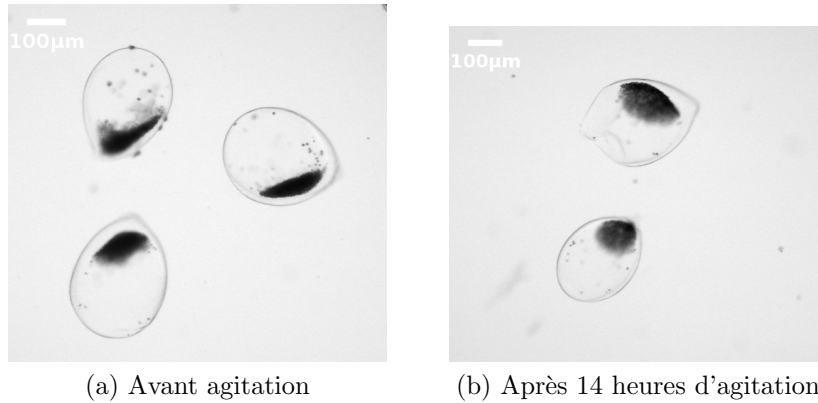


FIGURE 2.51 – Effet de l'agitation sur les capsules.

La résistance de cette membrane présente un intérêt certain : lorsqu'on réalise une culture de cellules dans un réacteur, il est commun d'enrichir le milieu en oxygène. Ce dernier est apporté dans le milieu via des bulleurs. La présence de bulles de gaz dans une telle culture induit une mort cellulaire [79]. Cette mort cellulaire a plusieurs origines, que ce soit le contact entre une cellule et la bulle [80] ou lors de l'éclatement de celle-ci [81]. Il est possible d'ajouter des additifs (tensio-actifs tels que le Pluronic F86 ; polymères tels que la cellulose, alcool polyvinylique, polyéthylène glycol, polyvinylpyrrolidone ; protéines telles que la BSA) [80], cependant des additifs induisent d'autres contraintes (coût, impact sur les cellules). Notre technologie d'encapsulation pourrait être ici d'une grande aide, car elle permettrait de séparer physiquement les cellules des bulles, empêchant ainsi les bulles de gaz d'avoir un impact délétère sur les cellules.

De plus, cette barrière physique isole les cellules encapsulées des contraintes de cisaillement, ce qui permet de protéger les cellules encapsulées des contaminations et des contraintes de cisaillement. Si ce dernier point n'est pas critique pour les algues, il l'est pour les cultures de cellules de mammifères.

Enfin, la présence d'une membrane semi-perméable pourrait être d'une grande aide pour lutter contre le fouling (encrassement) des bio-réacteurs à membrane [82]. Le fouling est une cause majeure de la baisse de performance de ces réacteurs. Il n'y a pas de consensus clair sur les causes de ce phénomène, mais il semble que les polymères excrétés par les cellules jouent un rôle prépondérant. L'encapsulation de ces cellules pourraient empêcher le dépôt de ces polymères sur les parois et les membranes, ce qui laisserait les performances intactes et épargneraient des opérations de nettoyage coûteuses.

#### 2.4.4 Conclusion et perspectives

Les preuves de concept que nous apportons nous permettent de dire que l'utilisation de capsules n'impactent pas de manière importante la production de molécules d'intérêt. Cependant, des données quantitatives manquent afin de statuer plus finement sur la question.

Nous avons démontré que l'encapsulation permet de simplifier considérablement les bioprocédés. En effet, les capsules simplifient considérablement les manipulations et les changements de milieu de culture ; elles permettent de protéger les cellules encapsulées (contraintes de cisaillement, dégâts occasionnés par le bullage de gaz) ; elles pourraient permettre de limiter les problèmes liées au fouling.

Enfin, les capsules ouvrent une voie pour des procédés de bioproduction plus ambitieux et plus complexes, reposant sur des inductions ; ou encore sur des cocultures. Elles permettent aussi de cultiver de manière protégée de cellules fragiles à très haute valeurs ajoutée, telles que des cellules souches hématopoïétiques.



## 2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons adapté un procédé d'encapsulation à nos contraintes de travail, et mis au point des milieux de culture compatibles. Nous avons démontré l'absence d'impact négatif de l'encapsulation sur *Chlamydomonas reinhardtii*; ce qui nous a amené à mettre au point des outils de mesure spécifiques et adaptés. Nous avons mis en évidence des phénomènes de concentrations cellulaires dans les capsules, qui pourraient être un apport majeur pour les bioprocédés. Il nous semble intéressant de faire le parallèle avec les cultures en milieu autotrophe : dans un tel contexte, l'apport de lumière est un facteur qui devient limitant. À mesure que la culture se densifie, la lumière est de plus en plus absorbée, ainsi le rendement photosynthétique global diminue. Grâce à nos capsules, nous sommes capables d'apporter à flux constant des nutriments, ainsi nous ne sommes pas limité par cet aspect. Nous avons aussi mis au point un procédé innovant de décontamination de la phase continue spécifiquement, qui fait l'objet d'un dépôt de brevet [83]. Nous avons enfin mis en évidence l'apport de l'encapsulation pour l'induction de la sécrétion de lipides.

L'induction de la sécrétion de lipides, ainsi que d'autres thématiques au laboratoire sur les cellules souches, nous amène à examiner la problématique du criblage de séquences de conditions de culture. En effet, les changements de milieux et l'ordre dans lequel ils sont fait ont des impacts sur les cultures cellulaires. Il n'existe pour le moment pas d'outil de criblage de séquences de conditions de culture pour des cellules planctoniques, ou pour des cellules adhérentes ayant besoin d'un support spécifique. Dans le chapitre suivant, nous proposerons une solution à cette problématique, basée sur des capsules.

Nous terminons ce chapitre sur ce qui pourrait devenir un produit cosmétique à base de microalgues encapsulées vivantes. Un tel produit, présenté en figure 2.52, permet de dérouler un discours autour de la protection d'actifs fragiles et de la préservation de cellules aux bienfaits supposés inégalés. Le fait que les capsules soient visibles à l'œil nu permet de donner plus de poids à ce discours, et l'esthétisme fait le reste.

Il nous reste à dépasser cette preuve de concept pour pouvoir la mettre en œuvre dans un contexte industriel. Cela nécessite de trouver un partenaire adéquat, que ce soit une entreprise ou un laboratoire de bioprocédé.

CONFIDENTIEL



FIGURE 2.52 – Concept de produit à base de microalgues encapsulées.

# Chapitre 3

## Screening combinatoire

### Sommaire

---

<b>3.1 Séquences des conditions de culture pour les bio-procédés . . . . .</b>	<b>93</b>
3.1.1 Importance et techniques actuelles de criblage . . . . .	93
3.1.2 Le split-pool : un outil parfait pour cribler des séquences de conditions de culture . . . . .	95
3.1.3 Vue d'ensemble du procédé . . . . .	98
3.1.4 Conclusion . . . . .	99
<b>3.2 Marquage de capsules : enjeux et avantages pour le criblage com- binatoire . . . . .</b>	<b>99</b>
3.2.1 Apport des capsules . . . . .	99
3.2.2 Enjeu : le marquage . . . . .	103
<b>3.3 Marquage des capsules avec des colloïdes . . . . .</b>	<b>106</b>
3.3.1 Adsorption de colloïdes sur les capsules grâce à des liaisons faibles : preuve de concept avec billes magnétiques . . . . .	106
3.3.2 Utilisation de Quantum Dots . . . . .	115
3.3.3 Utilisation de particules de silice fluorescentes . . . . .	119
<b>3.4 Conclusion . . . . .</b>	<b>123</b>

---

Dans ce chapitre, nous mettrons en évidence l'intérêt de cribler des séquences de conditions de culture, et les défis que cela pose. Cette problématique se pose dans le contexte de la production de molécules d'intérêt par des micro-organismes, mais aussi lors de la différenciation de cellules souches et des différentes inductions auxquelles sont soumises les cellules. Après avoir explicité les contraintes qu'un tel criblage impose, nous détaillerons les essais que nous avons tenté.

## 3.1 Séquences des conditions de culture pour les bio-procédés

### 3.1.1 Importance et techniques actuelles de criblage

#### Importance

Dans le cadre d'un bio-procédé, une grande importance est accordé au choix du micro-organisme, eu égard à son rendement. Pour cela, diverses méthodes de screening ont été élaborées [84] [85] [69] [86]. La microfluidique a été utilisée dans ce contexte [87] [86] [88].

La bioproduction de molécules d'intérêt peut reposer sur des organismes génétiquement modifiés ou non. Dans le premier cas, le travail d'ingénierie génétique consiste à créer la souche qui produit la molécule d'intérêt avec le meilleur rendement possible. Dans le deuxième cas, deux stratégies sont possibles : soit il existe un organisme qui produit nativement cette molécule, comme *Botryococcus braunii* pour les hydrocarbures ; soit il faut éliciter, c'est-à-dire appliquer un forçage physiologique, afin d'orienter le métabolisme des cellules vers la production de la molécule. Le procédé comporte généralement une première phase où le but est d'atteindre une concentration cellulaire importante, puis une seconde phase où l'on induit la production de la molécule [25]. C'est ce que nous avons vu au chapitre précédent, en encapsulant des *Chlamydomonas reinhardtii* Sta6CW15, en les laissant croître puis en les privant d'azote. Cette contrainte induit la sécrétion de lipides. L'équilibre entre la phase de croissance et la phase de production est crucial, car il a de fait un impact sur le rendement du bioprocédé.

Nombre de paramètres peuvent influencer le rendement : pH, composition du milieu en générale, température, moment d'application de la contrainte physiologique, intensité de ladite contrainte, cycle application/absence de contrainte. Ainsi, déterminer l'optimum de production nécessite de cribler un nombre de conditions de culture très important. Surtout, il est nécessaire de cribler des séquences de conditions de culture.

Cependant, les techniques de criblage de séquences de conditions de culture sont très peu développées. Nous pouvons citer des travaux académiques de *Kim et al.* [89], où des microalgues sont piégées dans une puce microfluidique. Puis les conditions d'éclairage peuvent être modifiées à loisir, ce qui permet d'étudier leur impact sur la physiologie des microalgues et la production de lipides. Cependant, les auteurs ne sont capables de faire varier que les conditions d'éclairage.

De même, les exemples de production industrielle de molécule d'intérêt basée sur une élicitation sont rares. Nous pouvons citer l'exemple d'une production industrielle reposant sur un

tel concept : la Snow Algae Powder<sup>1</sup> (Mibelle Biochemistry Group) [90]. Ce produit est issu de la culture d'une algue extrémophile, une espèce de *Chlamydocapsa* qui pousse l'été sur les neiges des Alpes, d'où le nom « algues des neiges ». Afin de se protéger des rayons UV intense, cette microalgue synthétise des caroténoïdes, actif prisés en cosmétique. Mibelle Biochemistry Group a mis au point un bioréacteur dans lequel les cellules sont tout d'abord mis en culture dans des conditions classiques pendant trois semaines. Ensuite, l'apport en nutriment est fortement réduit et la lumière fortement augmentée, et ce pendant deux semaines, conduisant à une production de caroténoïdes, comme montré en figure 3.1. Les microalgues sont ensuite récoltées et traitées.

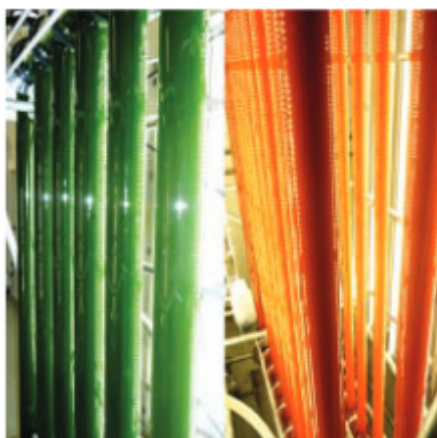


FIGURE 3.1 – photo-bioréacteur tubulaire avec des « algues des neiges ». À gauche, la première phase de culture (apport de nutriments, éclairage modéré), à droite la phase d'élicitation (privation en nutriments, éclairage intense), qui induit une production de caroténoïdes, d'où la couleur orangée.

Cet exemple, s'il est intéressant, reste cependant simple dans sa mise en œuvre, et repose principalement sur un changement des conditions d'éclairage. Il serait intéressant, par exemple, de savoir si des cycles d'applications/relâchement de la contrainte permettrait d'obtenir un meilleur rendement ; ou de connaître l'influence de la dureté de la contrainte sur la production de molécules d'intérêt.

Il y a donc un manque d'outil de criblage de séquences de conditions de culture. Il n'existe pas de méthode pour changer facilement les milieux de culture, ou faire varier le temps auquel les conditions de culture sont modifiées. Mettre au point un tel outil pourrait donc avoir un impact sur le développement de bio-procédés. Cependant, cela nécessite d'avoir des outils performants pour cribler des séquences de conditions de culture. Ces outils seraient de plus très utiles dans le domaine des cellules-souches. En effet, le devenir d'une cellule-souche est régi par les facteurs de différenciation auxquels elle a successivement été exposée, par le moment et la durée de ces expositions. Ainsi, un outil puissant de criblage de séquences de conditions de culture

---

1. <https://mibellebiochemistry.com/fr/products/snow-algae-powder/>

permettrait de cribler un grand nombre de voies de différenciation, ce qui n'est pas possible à l'heure actuelle.

## Méthodes classiques

Commençons par préciser quelques chiffres. Plaçons nous dans un cas simple, et considérons un procédé où l'un paramètre peut prendre 3 valeurs différentes. Cela peut être par exemple une concentration en un nutriment particulier dans le milieu de culture. Si nous souhaitons cribler toutes les séquences de conditions de culture générées par 5 changements de conditions, le nombre de chemins que l'on peut parcourir est  $3^5 = 243$ . Ce nombre est évidemment bien trop conséquent pour être réalisé à la main. Il est donc nécessaire de s'orienter vers d'autres méthodes. Il est tout à fait possible d'utiliser un robot manipulant des microplaques pour réaliser un tel criblage. Cette méthode serait aussi applicable pour des cellules planctoniques, puisque des centrifugeuses de microplaques existent (Agilent pour ne citer qu'eux). Cependant, ceci implique des coûts exorbitants, que ce soit en terme d'investissement, de maintenance, ou de fonctionnement (cônes, réactifs).

Il existe une méthode plus subtile et plus puissante pour cribler des séquences de conditions : le criblage combinatoire ou split-pool.

### 3.1.2 Le split-pool : un outil parfait pour cribler des séquences de conditions de culture

#### Concept

Les premières utilisations de la combinatoire en chimie remontent aux années 1960. Bruce Merrifield met au point une méthode de synthèse de banque de peptides utilisant ce principe [91]. Le concept est illustré en figure 3.2. Trois acides aminés différents sont à disposition (jaune, bleu, rouge), ainsi qu'un support (en noir). La première étape consiste à séparer la population de supports en trois lots identiques, puis à greffer un acide aminé sur chaque de ces lots. Puis ces lots sont rassemblés et mélangés, c'est la fin du premier cycle. Ensuite, la population est à nouveau scindée en trois lots. Chacun de ces trois lots contient à la fois des supports greffés avec le premier, le deuxième et le troisième acide aminé. On procède enfin à un deuxième greffage, ce qui donne 9 peptides différents. Avec 3 acides aminés, et en faisant  $n$  cycles, le nombre de combinaisons différentes produit par cette méthode est  $3^n$ , ce qui devient rapidement considérable.

Ce concept a été et est toujours utilisé dans l'industrie, que ce soit en pharmacie (Chiron), en biotechnologie (Mimotopes), ou encore en science des matériaux (catalyse, électronique, etc.) par des acteurs tels que Symyx Technologies, General Electrics ou encore Dow Chemical [92][93].

Ce procédé implique cependant un problème de taille : il est en effet impossible de savoir *a priori* la séquence du peptide fixé sur un support donné. Pour contourner ceci, d'autres groupes ont proposé des méthodes basées sur des trempage successifs de supports dans des bains [94], ou encore sur un étiquetage de chaque support grâce à une technologie radio-fréquence [95],

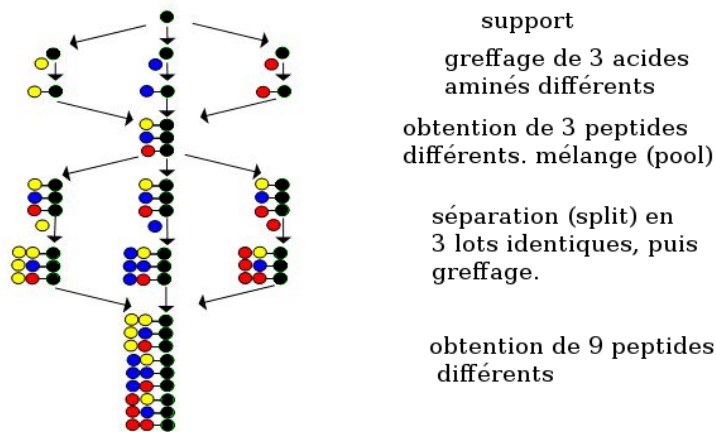


FIGURE 3.2 – Chimie combinatoire : concept du split-pool. Adapté de Wikipedia.

qui permet de diriger chaque véhicule dans un réacteur défini en fonction du code-barre qu'elle porte. Ainsi, chaque support suit un chemin déterminé à l'avance.

Une autre manière de procéder est de disperser les supports aléatoirement dans les baignoires, mais d'être capable de retracer leur histoire *a posteriori*. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir marquer chaque support par une étiquette spécifique du bain dans lequel il a séjourné.

Ce concept est donc tout à fait adapté au criblage de séquences de conditions de culture.

### Application au criblage de séquences de conditions de culture

Nous pouvons utiliser le concept du split-pool pour cribler des séquences de conditions de culture avec nos capsules. Pour cela, il suffit de déplacer les capsules de bain en bain, exposant ainsi les cellules encapsulées à des conditions de culture différentes. Deux stratégies sont alors possibles : soit on détermine *a priori* la séquence de conditions de culture que va connaître une capsule, et celle-ci est déplacée en conséquence ; soit les capsules sont marquées spécifiquement à chaque séjour dans un milieu, et leur histoire est révélée *a posteriori*.

La technologie de manipulation de capsule une par une n'est pas encore mature, aussi nous avons préféré nous orienter vers la seconde stratégie. La première est pourtant tout à fait valide, surtout avec les développements de l'impression 3D, qui permet de concevoir des pièces adaptées à des usages très spécifiques.

CONFIDENTIEL

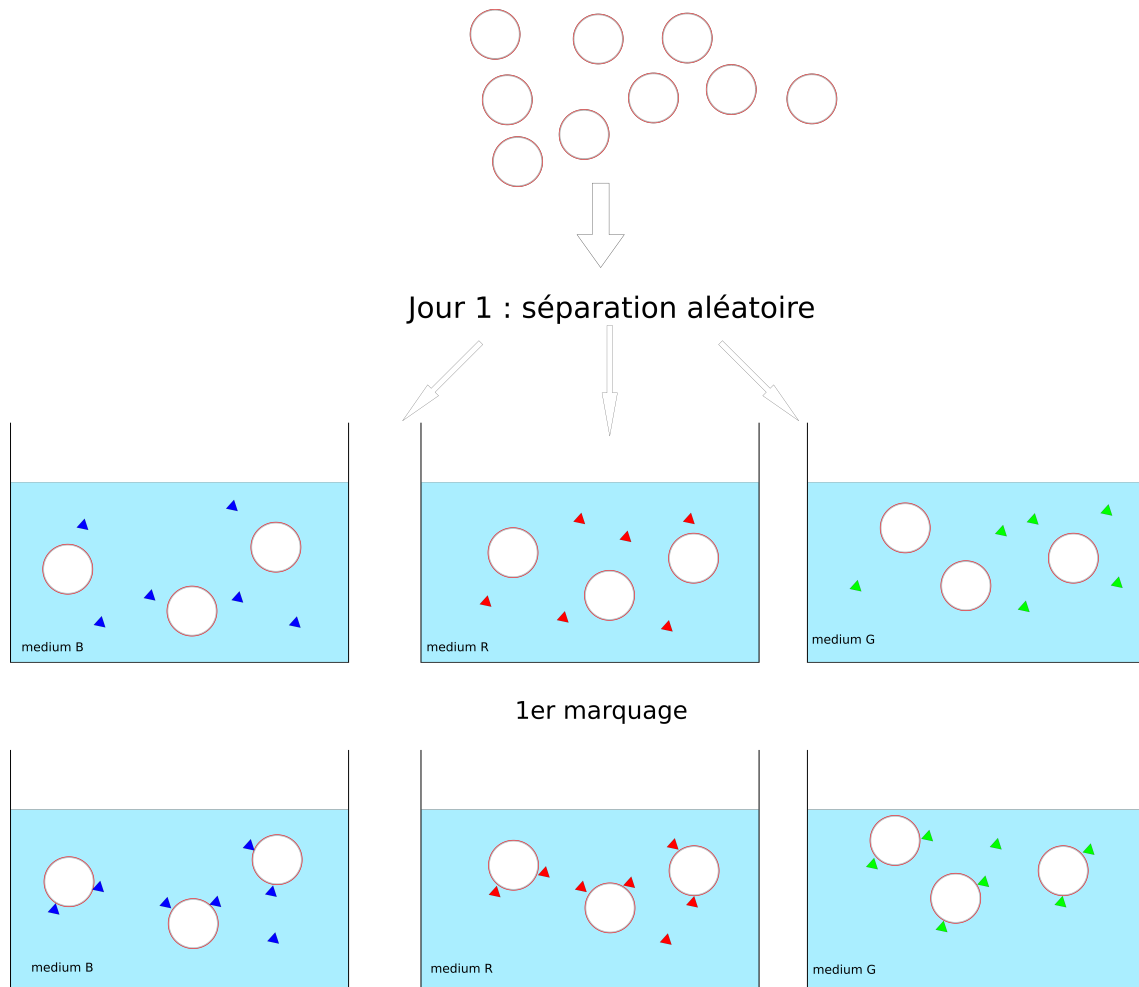
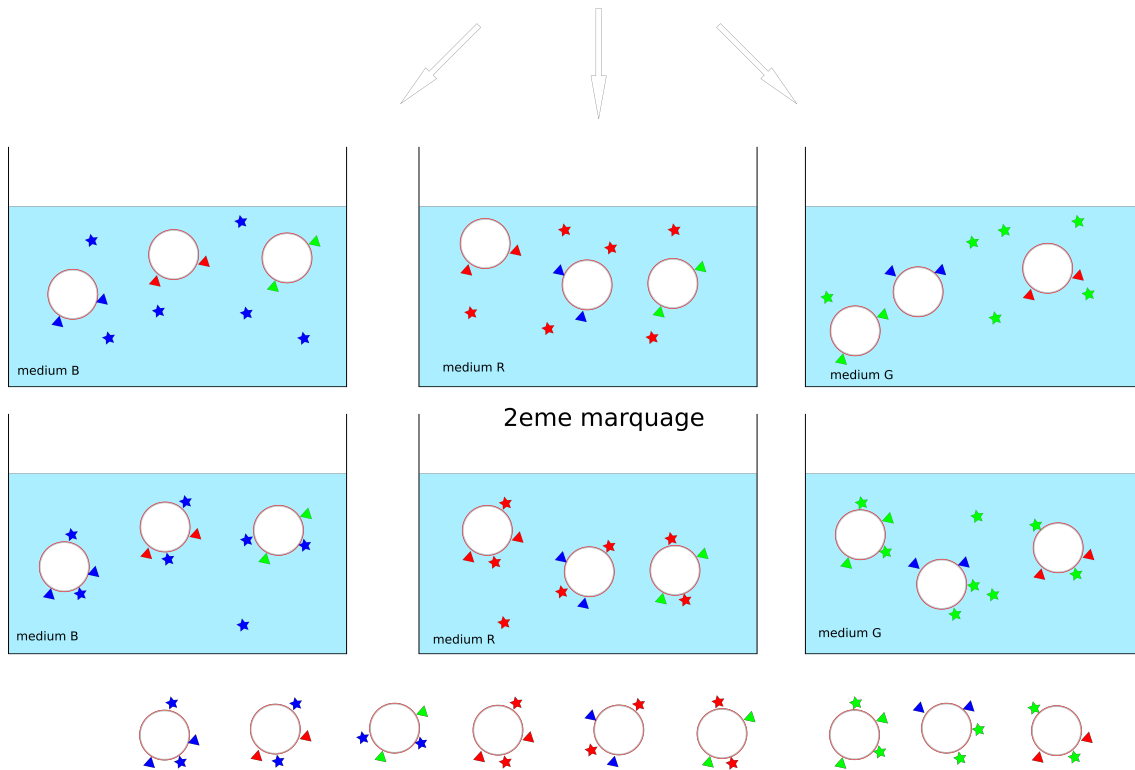


FIGURE 3.3 – Concept du split-pool 1/2 : l'objectif est de voir les effets de 3 milieux de culture différents et de leur séquence, avec deux incubations successives. Une population de capsule est séparée en trois lots, chacun est incubé dans les milieux (B, R et G). Les milieux contiennent un marqueur spécifique, qui s'adsorbent sur les capsules. ces dernières sont ainsi marquées.

Nous pouvons donc mettre au point un procédé complet de screening de séquences de conditions de culture



Jour 2 : collecte, puis séparation aléatoire



2 étapes de marquage, 9 séquences différentes

FIGURE 3.4 – Concept du split-pool 2/2 : les capsules sont ensuite collectées, mélangées et la population est séparée aléatoirement en trois lots. Chacun est incubé dans les milieux (B, R et G). Les milieux contiennent un marqueur spécifique, différents de ceux utilisés à l'étape précédente. Les capsules sont ensuite collectées. Neuf sous-populations sont distinguables, chacune a connue une histoire différente et est marquée de manière univoque. Cela a nécessité seulement deux étapes de marquage et 6 marqueurs différents.

### 3.1.3 Vue d'ensemble du procédé

Ce procédé est le fruit d'une vision intégrale du criblage. Il se déroule en quatre étapes :

1. Encapsulation de cellule et criblage combinatoire ;
2. Test fonctionnel ou morphologique, quantification de biomasse ou d'expression de molécule d'intérêt, calcul de rendement ;
3. Tri des capsules pertinentes pour déterminer leur histoire, et éventuellement analyse plus fine
4. Détermination des séquences de conditions de culture

Concernant la deuxième étape, nous avons démontré que nous étions capable de mesurer la concentration de microalgues en capsule, ainsi que la sécrétion de lipides par des algues encapsulées. De nombreux tests phénotypiques existent, certains impliquent un fluorophore, d'autres reposent sur des mesures purement physique, comme la spectroscopie Raman pour les lipides [96]. Du reste, le laboratoire possède un savoir-faire dans la mise au point de tests fonctionnels qui le rend tout à fait pertinent pour développer des tests fonctionnels.

Concernant la troisième étape, il est tout à fait possible de trouver des outils pour trier des objets de quelques centaines de microns de diamètre. On peut citer par exemple le COPAS Flow Pilot, ou encore l'outil de tri développé par une startup du laboratoire, MilliDrop.

La quatrième étape est tout l'enjeu de ce développement, il nous faut mettre au point une stratégie de codage des séquences de conditions de culture que traversent successivement les capsules.

### 3.1.4 Conclusion

Nous avons mis en lumière la nécessité de mettre au point un outil de criblage de séquences de conditions de culture pour améliorer les bio-procédés. Ceci implique de pouvoir explorer un grand nombre de chemins possibles. Le criblage combinatoire permet de répondre à cette problématique, et pose des défis auquel le laboratoire est bien armé pour répondre.

Nous avons vu précédemment que la stratégie décidée impliquait de devoir marquer chaque capsule en fonction du bain dans lequel elle a séjourné. Nous allons maintenant nous intéresser à la stratégie de marquage ; en ayant préalablement exposé les avantages conférés par les capsules pour ce procédé.

## 3.2 Marquage de capsules : enjeux et avantages pour le criblage combinatoire

### 3.2.1 Apport des capsules

Nous avons exposé en fin de chapitre précédent les avantages conférés par la culture de cellules en capsule. Les facilités de manipulation sont évidemment un gros avantage pour faire du criblage combinatoire.

Une entreprise britannique nommé Plasticell est déjà engagée sur cette voie [97], et a développé une technologie nommée CombiCult<sup>®</sup> [98]. Cela consiste à faire adhérer des cellules-souches sur des microbilles, puis à réaliser un criblage combinatoire à l'aide de celles-ci. Cependant, cette technologie n'est utilisable qu'avec des cellules adhérentes, ce qui limite le spectre des possibilités. De plus, les cellules étant adsorbées sur la surface des billes, elles sont au contact des marqueurs, ce qui peut altérer leur physiologie. De manière plus générale, comme elles se sont pas protégées, elles sont exposées aux agressions du milieu extérieur (cisaillement, bulles d'air, etc.).

## CONFIDENTIEL

Grâce notre technologie, nous pouvons encapsuler et cultiver des cellules non adhérentes, comme des cellules planctoniques, ou encore des cellules souches hématopoïétiques. De telles cellules ont été cultivées via collaboration avec l'INSERM (UMR S938), comme montré en figure 3.5.

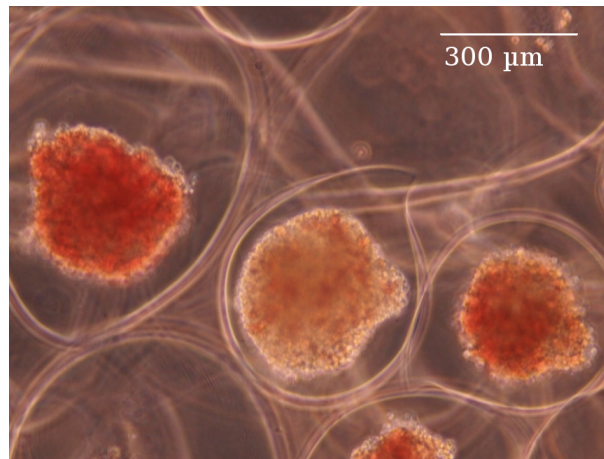


FIGURE 3.5 – Cellules souches hématopoïétiques en capsule. Crédit Guillaume Rousseau, 2013-2015.

## CONFIDENTIEL

Nous sommes capables de structurer nos capsules en ajoutant une couche intermédiaire entre la membrane d'alginate et le cœur liquide. Ceci permet de créer des structures complexes, plus proche de la réalité biologique que les boîtes de culture cellulaire. Ainsi, des capsules contenant une coculture de kératinocytes et de fibroblastes humains ont été créées au laboratoire, comme montré en figure 3.6. La couche intermédiaire est constituée de collagène, et héberge les fibroblastes ; les kératinocytes poussent à la surface de la couche intermédiaire et donnent sur le cœur liquide.

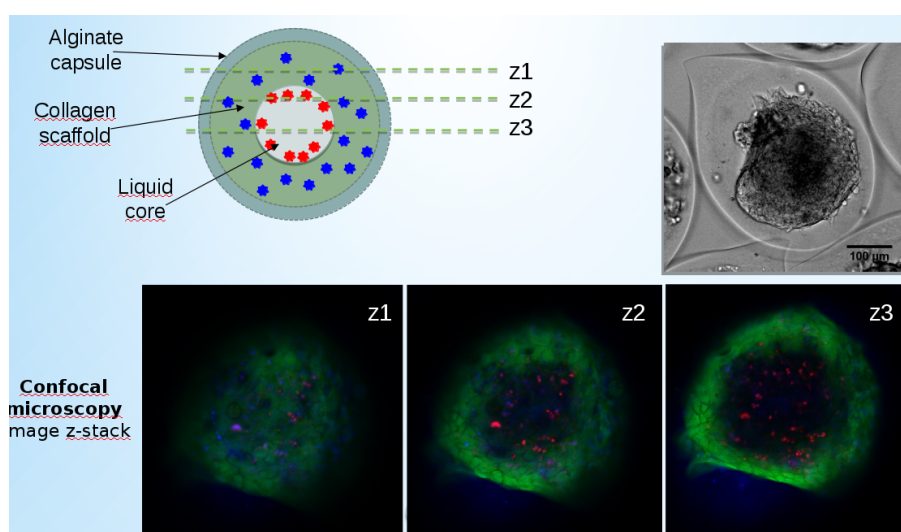


FIGURE 3.6 – Coculture en capsule de kératinocytes (HaCaT) et de fibroblastes (3T3) humains. La couche intermédiaire est constituée de collagène, et héberge les fibroblastes. Les kératinocytes poussent à la surface de la couche intermédiaire et donnent sur le cœur liquide. Les clichés du dessous sont pris au confocal ; le cytoplasme est marqué en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les noyaux des cellules mortes en rouge. La plupart des cellules sont donc vivantes. Crédit Anette Funfak 2011-2013.

Il est connu que la culture de cellules humaines telle qu'elle est pratiquée classiquement, à deux dimensions, présente des différences significatives avec les comportements et les morphologies constatées *in vivo*. Ces différences peuvent aller jusqu'à une viabilité significativement plus faible et courte, comme montré en figure 3.7.

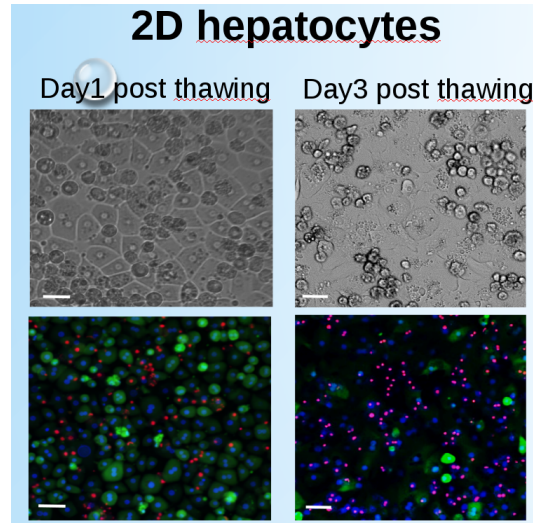


FIGURE 3.7 – Culture d'hépatocytes à 2D. Images au microscope optique (première ligne) et au microscope confocal (deuxième ligne) ; le cytoplasme est marqué en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les noyaux des cellules mortes en rouge. La plupart des cellules sont donc morte au troisième jour. On constate de plus une perte importante de l'activité métabolique (50% de perte de l'activité du cytochrome par jour). Crédit Noushin Dianat 2015-2016.

Ainsi, se rapprocher de la réalité biologique des cellules via la culture de cellules à trois dimensions est devenu un axe de recherche très actif, que ce soit dans une optique fondamentale ou appliquée [99]. L'encapsulation peut être utilisée pour cultiver des cellules à trois dimensions, comme montré ci-dessus. D'autre part, un projet en cours au laboratoire porte sur l'encapsulation d'hépatocytes, et apporte d'excellents résultats. Classiquement, il est impossible de garder les hépatocytes vivants plus de trois jours en culture. L'encapsulation permet de les garder en vie plus d'un mois, comme montré en figure 3.8.

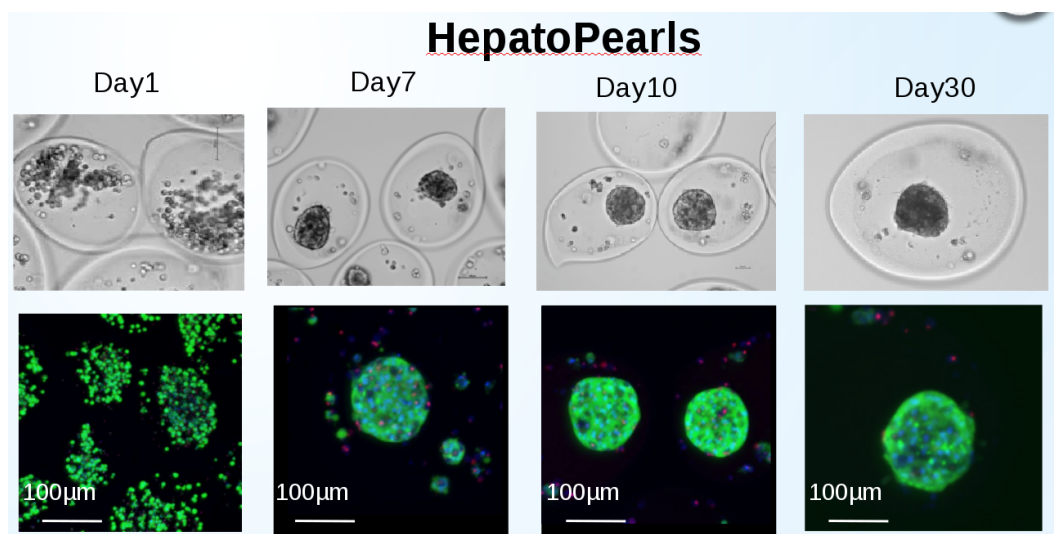


FIGURE 3.8 – Culture d’hépatocytes à 3D, en capsule. Images au microscope optique (première ligne) et au microscope confocal (deuxième ligne) ; le cytoplasme est marqué en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les noyaux des cellules mortes en rouge. La plupart des cellules sont donc vivantes après un mois. Crédit Noushin Dianat 2015-2016.

Notre technologie offre donc plus de possibilités en terme de types cellulaires utilisables et des conditions de culture plus adéquates. Elle permet de travailler avec des cellules non adhérentes ou avec des cellules ayant besoin d’un environnement à 3 dimensions pour survivre, ce que ne permet pas la technologie déployée par Plasticell. Notre technologie d’encapsulation apporte donc une plus-value de taille, que ce soit de manière générale ou pour les bioprocédés basés sur les microalgues. Il est donc tout à fait pertinent de faire du criblage combinatoire en capsule. De plus, fort de son savoir-faire, le laboratoire est bien armé pour faire face au défi que pose le marquage.

### 3.2.2 Enjeu : le marquage

L’enjeu du criblage combinatoire est d’avoir la capacité de marquer les capsules de manière univoque et durable. Nous allons présenter des généralités sur les contraintes que ce marquage doit respecter, puis exposer les choix que nous avons fait.

#### Contraintes à respecter

Il existe aussi un grand nombre de manière de marquer un véhicule, des méthodes les plus traditionnelles (fluorophores) aux méthodes plus exotiques.

Pour faire du criblage combinatoire, les marqueurs doivent remplir les conditions suivantes [100] :

- être disponibles en grand nombre, et facilement identifiables de manière univoque, de préférence de manière automatisée ;

## CONFIDENTIEL

- se fixer facilement et de manière permanente aux capsules, sans s'en détacher ni sauter sur une autre capsule ;
- être stables physiquement, non toxique et biologiquement inerte, idéalement ne pas pénétrer dans la capsule ;
- être détectable avec un bruit de fond généré par des cellules

Plusieurs marqueurs satisfont ce cahier des charges, à commencer par les fluorophores encapsulés dans des véhicules de polymères (polystyrène) ou de silice et les quantum dots. Ces particules sont utilisées depuis longtemps en biologie [101][102][103][104] et leur innocuité n'est plus à prouver. Il est possible de faire du multiplexage [105] ; soit en jouant sur les longueurs d'onde d'émissions, soit sur l'intensité, soit sur le temps de vie de luminescence [106] avec des complexes luminescents de lanthanides (europium et terbium par exemple). Des solutions commerciales de multiplexage existent (Luminex, Spherotec, etc.). Des appareils commerciaux existent pour mesurer la fluorescence de ces particules (cytomètre, lecteurs de plaque). Ces particules sont assez stables.

Les polymères fluorescents ne sont pas une bonne option, car peu de fluorophores différents sont disponibles. De plus, de petits polymères risqueraient de diffuser à travers la membrane d'alginate.

Les sondes d'ADN ou d'ARN peuvent aussi remplir ce rôle. La puissance de ce marqueur réside dans la capacité à créer une bibliothèque infinie de marqueurs différents. Cependant, ce choix implique de devoir séquencer ensuite, afin d'être capable de retracer l'histoire d'une capsule.

Il est aussi possible d'utiliser la spectrométrie de masse [107] en utilisant comme marqueurs des atomes ou isotopes lourds. Des méthodes comme la Tandem Mass Tag [108] ont été développées et sont disponibles commercialement pour du marquage de protéines, avec une excellente sensibilité. Nous ne souhaitons cependant pas nous lancer dans une telle voie, qui nous semblait lourde à mettre en place.

Nous ne souhaitons pas reprendre la technologie mise au point par Plasticell afin d'être totalement libres et maîtres de la situation. De plus, nous pensons être capable de pousser plus loin la technologie. Au vu de ce que nous avons énoncé concernant le cahier des charges des marqueurs, notre choix s'est porté sur les colloïdes.

### Choix des marqueurs : les colloïdes

Il existe une grande variété de colloïdes : billes magnétiques, fluorescentes ; en silice, en polymère ; quantum dots. Ils sont en majorité stables et biologiquement inertes, aussi font-ils de bons candidats pour le marquage. De plus, le laboratoire possède un savoir-faire tout à fait adapté pour travailler avec ces particules.

Le choix des colloïdes dépend du nombre de séquences de conditions de culture que l'on souhaite cribler.

Prenons un premier cas simple, où l'on souhaite cribler  $m = 3$  milieux différents avec  $d = 3$  changements. Cela fait donc  $m * d = 9$  marqueurs différents, et  $m^d = 27$  chemins (séquences

## CONFIDENTIEL

de conditions de culture différents. Il est commode d'avoir une dizaine de capsules par chemin parcouru, ce qui fait environ 270 capsules au total.

Passons maintenant à l'échelle supérieure, et supposons que l'on souhaite cribler  $m = 6$  milieux différents avec  $d = 6$  changements. Cela fait donc  $m * d = 36$  marqueurs différents, et  $m^d = 46\,656$  chemins (séquences de conditions de culture différents, pour environ 466 560 capsules au total. Ces nombres sont tout à fait réalistes.

Pour le premier exemple où il y a besoin d'un nombre relativement faible de marqueurs différents (une dizaine), il est commode d'utiliser des quantum dots ou des fluorophores classiques encapsulés dans des véhicules de silice ou de polymère. Comme mentionné précédemment, des outils existent pour détecter et trier des particules de plusieurs centaines de microns de diamètre, en s'appuyant sur des mesures de diffusion de lumière et de fluorescence.

Pour le deuxième exemple où il y a besoin de plus de marqueurs, les fluorophores voire les quantum dots ne suffisent plus. La meilleure solution de marquage nous semble d'utiliser des particules colloïdales à la surface desquelles sont greffées des sondes d'ADN. Il est en effet possible de générer des bibliothèques de billes magnétiques portant des sondes d'ADN ; chaque type de billes porte des sondes d'ADN uniques et identiques. Il est tout à fait possible d'établir des liaisons covalentes entre une sonde d'ADN et une bille magnétique, cette technologie est mature, et plusieurs méthodes existent (N-hydroxysuccinimide PEG [109] ou N-oxysuccinimide (Corning), I-Linker, voie enzymatique [110]). La création de bibliothèque d'ADN est tout à fait possible. Une telle bibliothèque donne accès à nombre de combinaisons faramineux (de l'ordre de 10000 [110] à 1 million [111]). Ces billes magnétiques sont biocompatibles [112] et sont du reste très utilisées pour l'isolation de cellules [113], par exemple des cellules tumorales circulantes.

Une fois le criblage combinatoire effectué et les capsules d'intérêt mises de côté, les billes magnétiques peuvent être récupérées en utilisant un aimant, ce qui permet de laisser les capsules intactes et tout en facilitant le séquençage des sondes d'ADN présents sur les billes. Ledit séquençage permet ensuite de remonter à l'histoire qu'a connue la capsule. Cette approche est plus lourde mais plus puissante que la première, et permet aussi de faire des tests fonctionnels reposant sur des mesures de fluorescence sans être impacté par le marquage des capsules.

Nous pouvons établir quelques ordres de grandeurs : les capsules avec lesquelles nous avons travaillé ont un diamètre de 260  $\mu\text{m}$ . Nous pouvons ainsi calculer un ordre de grandeur du nombre de particules nécessaires pour former une monocouche à la surface d'une telle structure, cf table 3.1. Ces ordres de grandeurs sont cohérents avec ce que nous souhaitons faire. En effet, même en admettant que moins de 10% de la surface est occupée par des billes de 1  $\mu\text{m}$  (hypothèse conservatrice), cela nous laisse la place de fixer au moins  $6 \cdot 10^3$  billes, donc 1000 billes par marquage de milieu. Ceci est largement suffisant pour que nous puissions travailler.

Dans les deux cas, les marqueurs satisfont à 3 des quatre conditions explicitées plus haut : ils sont disponibles en grand nombre et sont identifiables de manière univoque, sont *a priori* détectables, stables et biologiquement inertes. Tout l'enjeu est de fixer de manière contrôlée et permanente ces colloïdes sur les capsules. Cette approche est générique, ce qui fait sa puissance. Le laboratoire est bien armé pour mener à bien ces travaux.



diamètre de la particule	nombre nécessaire pour former une monocouche
200 nm	$1,7 \cdot 10^6$
1 $\mu\text{m}$	$6,7 \cdot 10^4$

TABLE 3.1 – Ordre de grandeur du nombre de particules nécessaire pour former une monocouche à la surface d’une capsule de 260  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Le marquage avec des sondes d’ADN représente toutefois une somme de travail très conséquente, et nous avons préféré réaliser une preuve de concept nécessitant moins de travail en amont. Nous avons donc décidé de faire une preuve de concept avec des billes magnétiques, puis de poursuivre le travail avec des marqueurs fluorescents. Cela permet de simplifier l’établissement de la preuve de concept, sans altérer la faisabilité de tout le processus. Nous allons donc aborder le marquage de capsules par des colloïdes, en commençant par détailler le moyen de fixation desdits colloïdes sur les capsules.

### 3.3 Marquage des capsules avec des colloïdes

Nous avons tout d’abord fait le choix de la méthode de fixation des colloïdes sur nos capsules. Établir des liaisons covalentes entre ces deux objets nous semblait présenter trop de contraintes, notamment vis à vis de la physiologie des cellules encapsulées. Nous nous sommes donc tournés vers des liaisons faibles. Puis nous avons travaillé avec plusieurs types de particules.

#### 3.3.1 Adsorption de colloïdes sur les capsules grâce à des liaisons faibles : preuve de concept avec billes magnétiques

##### Utilisation de liaisons faibles

La membrane de nos capsules est constitué d’une hydrogel d’alginate. Ce dernier comporte 98% d’eau, l’établissement de liaisons de type Van Der Waals n’est pas envisageable.

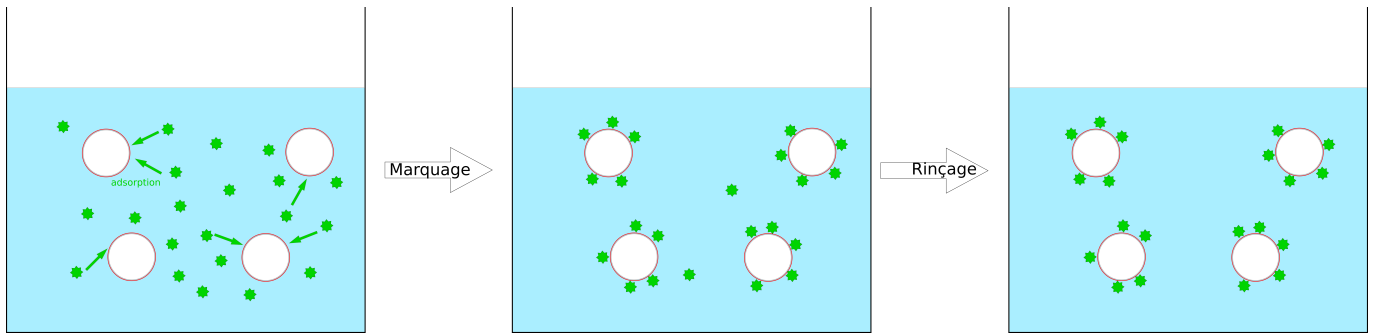
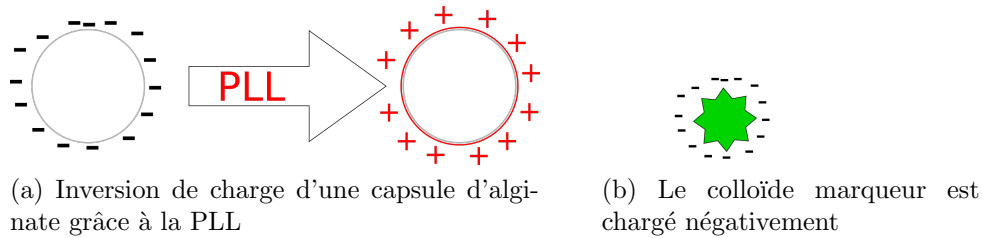
L’alginate est un polymère d’acides mannuronique et guluronique. Ces monomères possèdent une fonction COOH, dont les pKa sont respectivement de 3,38 et 3,65. Nos milieux de culture sont à pH 7, aussi ces fonctions sont-elles déprotonées. Les capsules d’alginate dans nos milieux sont donc chargées négativement. Il est donc possible d’établir des liaisons électrostatiques entre ces particules et les capsules. Ces liaisons sont plus faibles que des liaisons covalentes, mais la capacité à en créer un grand nombre peut permettre de maintenir les colloïdes adsorbés sur les capsules (c’est l’effet velcro).

Nos capsules sont chargées négativement. Les colloïdes que nous envisageons d’utiliser (particules de silice et billes magnétique) sont majoritairement chargées négativement. Il est donc nécessaire d’inverser la charge de l’une des particules.

Nous avons vu au chapitre précédent l’utilisation de polylysine (PLL) a des fins de contrôle de contamination. Ce polymère est chargé positivement, et peut donc s’adsorber sur la cap-

sule d'alginate pour former une couche autour de celle-ci [114]. Ainsi, la capsule est chargée positivement et peut développer des interactions électrostatique avec des colloïdes chargés négativement, comme illustré en figure 3.9.

Nous aurions pu recouvrir les particules colloïdales de PLL et ainsi inverser leur charge. Cela est tout à fait possible, mais requiert d'ajuster certaines paramètres finement (concentration en PLL et en particules) afin d'éviter l'agrégation des colloïdes lors du traitement à la PLL. De plus elle requiert des étapes de centrifugation et de lavage. Cela n'était pas très commode, aussi nous nous sommes focalisés sur l'adsorption de PLL sur les capsules.



(c) Les colloïdes sont mis en présence des capsules dont on a préalablement inversées la charge. Les colloïdes et les capsules interagissent électrostatiquement. Une étape de rinçage enlève les colloïdes encore présents en solution.

FIGURE 3.9 – Marquage de capsule avec des colloïdes chargés négativement. Le procédé met en œuvre une inversion de la charge des capsules grâce à la PLL.

Nous avons l'intuition que ceci est tout à fait faisable, mais cela reste à démontrer. Le laboratoire possède en tout cas un très bon savoir faire dans ce type de physico-chimie, de plus ceci est dans la continuité de ce qui a été réalisé au chapitre précédent. Cette approche a de plus l'avantage de ne pas nécessiter beaucoup de manipulations ou d'étapes. Essentiellement, les éléments sont mis en présence, une fois l'auto-assemblage réalisé il ne reste qu'à laver afin de pouvoir continuer les expériences.

Enfin, ces interactions sont favorables thermodynamiquement, comme nous l'expliquons en figure 3.10. Avant adsorption sur une surface d'une particule portant plusieurs charges (en l'espèce un polymère), il n'y a qu'une espèce en solution. Après adsorption, il y a autant d'ions en solution que d'interactions ioniques développée par la particule adsorbée. Ainsi, l'entropie du système augmente, ce qui est thermodynamiquement favorable.

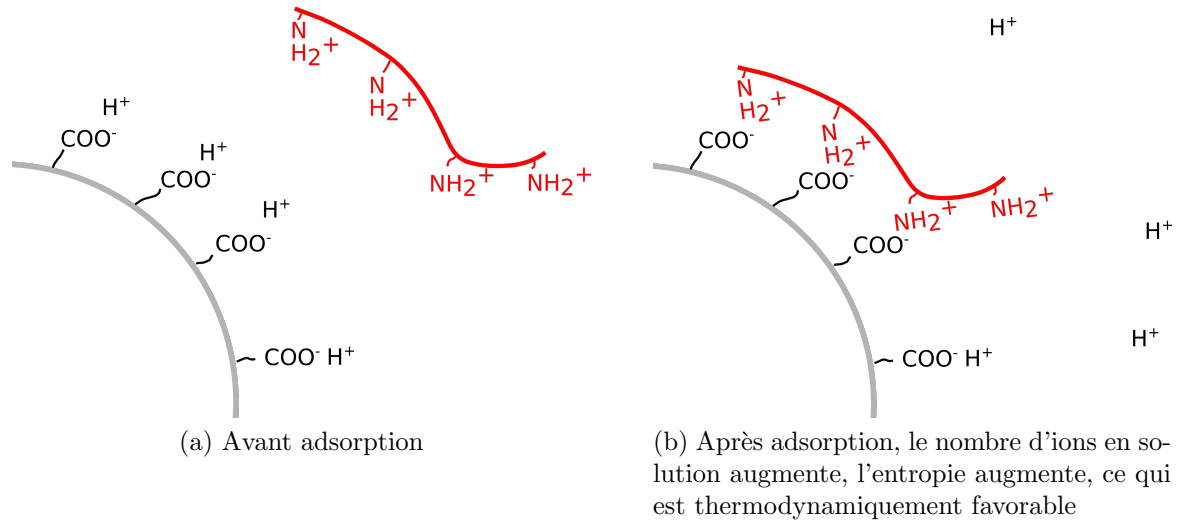


FIGURE 3.10 – Stabilité thermodynamique de l'adsorption électrostatique d'un polymère sur une surface.

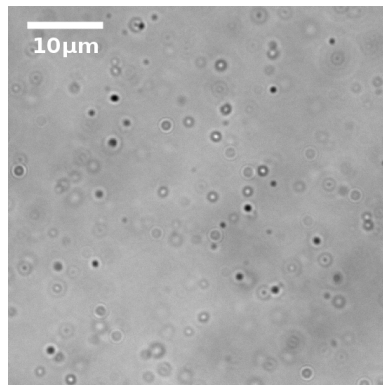
Nous avons commencé par établir la preuve de concept avec des billes magnétiques, pour des raisons de simplicité.

### Preuve de concept

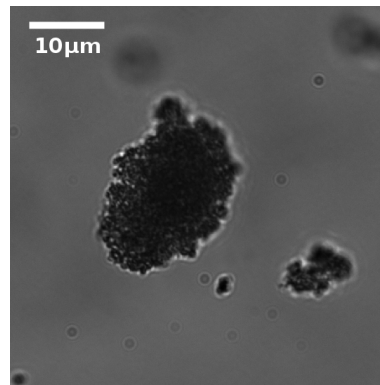
Pour valider cette méthode, nous réalisons une preuve de concept avec des billes magnétiques. Ces particules sont composées d'un cœur paramagnétique encapsulé dans une coque en polymère (Ademtech, Carboxyl-Adembeads 0212) ou en silice (Ademtech, Silica-Adembeads 0252). Ces billes font 200 nm de diamètre. Les premières portent en surface des groupements carboxyles, les deuxièmes des silanols. Ainsi, ces billes portent une charge de surface négative. Leurs potentiels Zeta sont mesurés grâce à un Zetasier ZS, et valent respectivement -9,4 mV et -33,4 mV. Ces billes sont donc très susceptibles de développer une interaction ioniques avec une surface chargée positivement.

Ces particules restent individualisées en solution grâce aux répulsions électrostatiques (électrostatiques et stériques dans le cas des Carboxyl-Adembeads) qu'elles exercent l'une sur l'autre. Notre milieu contient des ions. Ceux-ci génèrent un écrantage de charges et qui diminue la distance sur laquelle les interactions ioniques se font ressentir. Ceci causerait une agrégation de la suspension colloïdale, ce qui n'est absolument pas souhaitable.

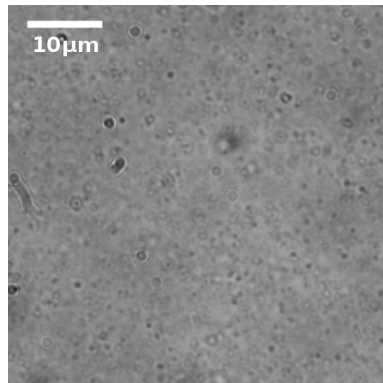
Nous vérifions donc si ces particules sont stables dans le MCCM. Pour cela, il suffit de disperser lesdites particules dans du MCCM, d'attendre une vingtaine de minutes et de regarder au microscope l'état de la suspension. Pour comparaison, nous faisons la même expérience dans du chlorure de calcium 100 mM. Les clichés sont présentés en figure 3.11. Ces particules ne s'agrègent pas dans le MCCM, nous pouvons donc travailler avec sans problème.



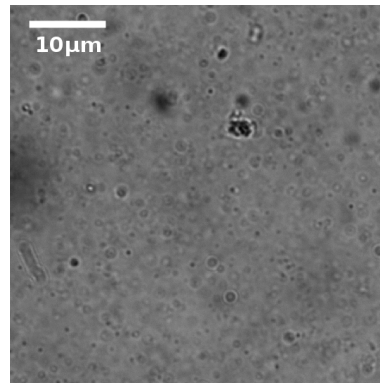
(a) Particules de silice (200 nm) dans le MCCM



(b) Particules de silice (200 nm) dans du  $\text{CaCl}_2$  100 mM



(c) Particules de polymère fonctionnalisées COOH (200 nm) dans le MCCM

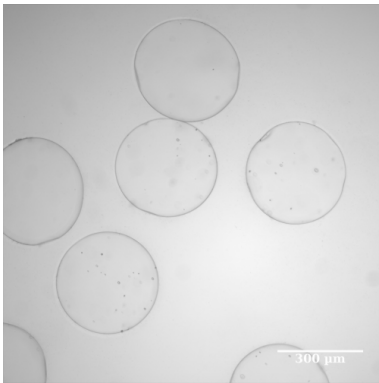


(d) Particules de polymère fonctionnalisées COOH (200 nm) dans du  $\text{CaCl}_2$  100 mM

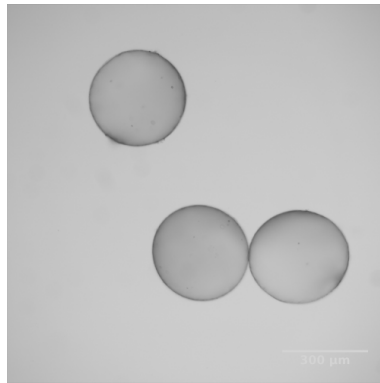
FIGURE 3.11 – Particules de silice et particules de polymère fonctionnalisées COOH, dans le MCCM et dans du  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Les suspensions colloïdales ne s'agrègent pas dans le MCCM.

Nous allons vérifier si nous pouvons adsorber des particules colloïdales chargées négativement sur nos capsules préalablement chargées positivement. Nous incubons une centaine de billes d'alginate dans 200  $\mu\text{L}$  de MCCM additionné de 0,001% de PLL (DKSH), pendant une vingtaine de minutes. Les billes sont ensuite lavées avec du MCCM. Puis, 5  $\mu\text{L}$  d'une suspension de billes magnétiques sont ajoutées, et le tout est laissé à incuber 30 minutes.

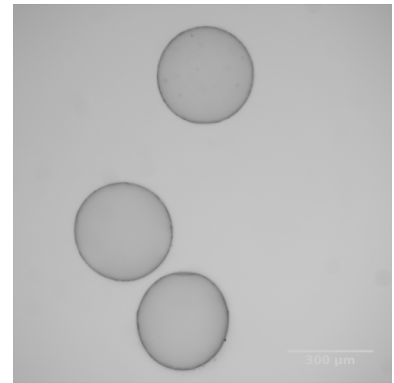
Un contrôle est réalisé avec des billes n'ayant pas été en présence de PLL. Les billes sont ensuite imagées, les clichés sont montrés en figure 3.12.



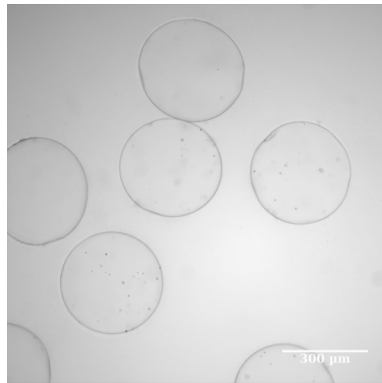
(a) Billes d'alginate couvertes de PLL



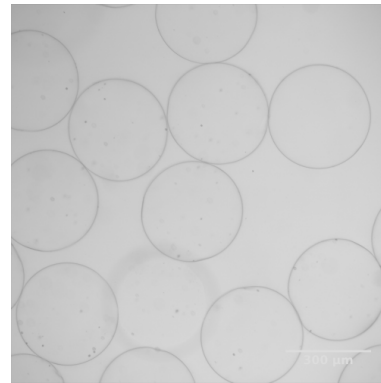
(b) Billes d'alginate couvertes de PLL après exposition à des particules de silice



(c) Billes d'alginate couvertes de PLL après exposition à des particules de polymère fonctionnalisées COOH



(d) Billes d'alginate sans PLL après exposition à des particules de silice



(e) Billes d'alginate sans PLL après exposition à des particules de polymère fonctionnalisées COOH

FIGURE 3.12 – Utilisation de PLL pour permettre l'adsorption de particules de silice ou de particules de polymère fonctionnalisées COOH sur des billes d'alginate. Sans la couche de PLL, l'adsorption ne se fait pas. Les particules utilisées font 200 nm de diamètre (Ademtech).

Ainsi, nous démontrons que l'utilisation d'un polymère chargé positivement permet d'inverser la charge de surface de nos capsules. Ceci permet l'adsorption de particules chargées négativement à la surface des dites capsules.

Le même procédé est réalisé en laissant s'écouler plusieurs jours entre le traitement avec la PLL et l'ajout des billes magnétiques. Nous n'observons pas de différence avec les clichés montrés en figure 3.12, ce qui nous assure que la PLL reste bien adsorbée à la surface des capsules.

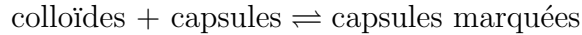
Après avoir établi ces premiers éléments de preuve de concept, nous nous sommes penchés

## CONFIDENTIEL

sur des aspects plus quantitatifs, ainsi que sur la robustesse du procédé.

### Aperçu de la physique de l'adsorption de colloïdes sur les capsules

L'adsorption de colloïdes sur les capsules peut être vu comme suit :



Une telle réaction est régie par une constante d'équilibre  $K$ . Si  $K$  est grand, l'équilibre est très déplacé vers la droite et les billes vont s'adsorber sur les capsules tant qu'elles le peuvent. Le nombre de billes adsorbées à la surface de la capsule est régi par la cinétique. Ainsi, si l'on met juste assez de billes pour qu'elles recouvrent la surface, ces billes vont toutes s'adsorber sur la capsule, n'en laissant aucune en solution.

À l'inverse, si l'équilibre n'est pas très déplacé vers la droite, il restera toujours des billes en solution. Le nombre de billes adsorbées à la surface de la capsule est régi par la thermodynamique.

Il est intéressant d'avoir une idée de la physique qui régit le procédé. Cela permet en effet de dimensionner les concentrations en colloïdes pour marquer convenablement la capsule. Il est de fait plus favorable d'avoir un procédé régi par une grande constante.

Pour ces expériences, nous avons besoin de compter les billes. Le moyen le plus approprié nous semble la cytométrie, et nous avons à disposition un Partec Flowmax ML. Nous décidons de travailler avec des billes plus grosses que celles présentées en figure 3.12, afin de pouvoir les détecter au cytomètre. Nous choisissons des billes magnétiques de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre fonctionnalisées COOH (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, ThermoFisher).

Nous commençons par nous assurer de la stabilité colloïdale de la suspension. Pour ce faire, nous utilisons un protocole identique à celui mis en place pour les billes de 200 nm de diamètre. Des clichés sont présentés en figure 3.13. Les particules ne s'agrègent pas dans le MCCM, aussi nous pouvons continuer à travailler avec.

Nous nous attelons à montrer que des billes magnétiques de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre s'adsorbent sur des capsules recouvertes de PLL. Pour ce faire, de telles capsules sont préparées, et une dizaine de ces capsules sont pipetées dans 500  $\mu\text{L}$  de MCCM. 5  $\mu\text{l}$  d'une suspension de billes magnétiques Dynabeads sont ajoutées. Il y a donc  $9 \cdot 10^7$  billes en solution.

Le tout est laissé à incuber 1 heure, puis les billes sont lavées avec du MCCM et sont ensuite imagées, un cliché est montré en figure 3.14. Ces billes s'adsorbent sans problème sur nos capsules. Nous les passons au cytomètre, et nous comptons  $7,6 \pm 0,25 \cdot 10^4$  billes adsorbées sur ces capsules. Cet ordre de grandeur et les clichés vont dans le sens de la formation d'une monocouche de colloïdes sur la capsule (cf table 3.1). Cela nous oriente vers un équilibre chimique plutôt déplacé vers la droite.

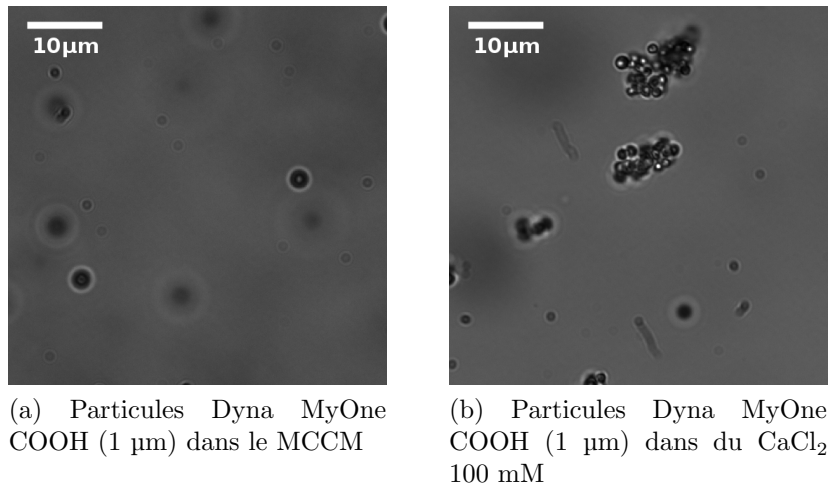


FIGURE 3.13 – Particules de silice et particules de polymère fonctionnalisées COOH, dans le MCCM et dans du  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Les suspensions colloïdales ne s’agrègent pas dans le MCCM.

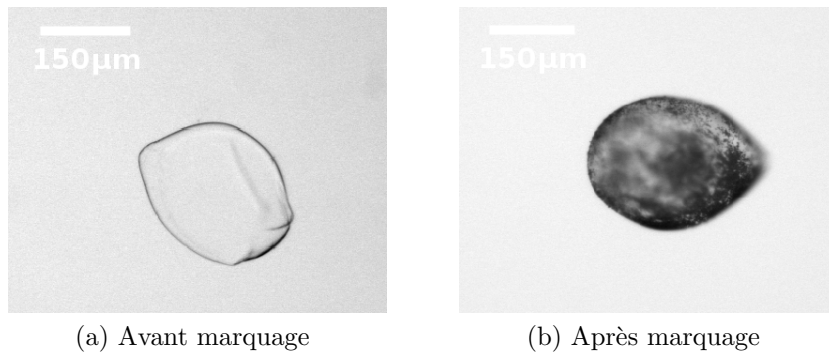


FIGURE 3.14 – Marquage d’une capsule avec des billes magnétiques de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Pour valider la physique qui régit notre équilibre d’adsorption, nous réalisons l’expérience suivante : 290 capsules préalablement couvertes de PLL sont pipettées dans 1 mL de MCCM.  $10^5$  Dynabeads sont ajoutées. L’ensemble de ces billes représente un recouvrement de la surface totale de 0,01%. Nous laissons réagir une douzaine d’heure, puis nous resuspendons les capsules, nous attendons qu’elles sédimentent puis nous prélevons le surnageant que nous passons au cytomètre. Il reste en solution 4.15% des billes injectées au début. Nous sommes donc plutôt dans le cadre d’un équilibre régi par une grande constante, ce qui nous est favorable. Une faible fraction de billes reste en solution, ce qui nous semble dû à la manière de procéder : d’une part ces billes sédimentent relativement vite (quelques heures), et il est cohérent de penser qu’une faible fraction de billes sédimente sans rencontrer de capsules ; de l’autre il est possible que nous arrachions des billes en manipulant les capsules.

Cette caractérisation est assez grossière, mais il ne nous pas semblé pertinent de la faire de manière plus fine.

## CONFIDENTIEL

Nous avons aussi souhaité contrôler si les billes se désorbaient de la capsule. Pour cela, nous prenons des capsules identiques à celles montrées en figure 3.14. Nous plaçons ensuite ces capsules dans une boîte de Petri et nous nous prenons un premier cliché, puis un deuxième après 12 heures. La DO des capsules est calculée à partir des images, ce qui permet d'être quantitatif. Les résultats sont présentés en figure 3.15. Les billes se désorbent peu de la capsule avec le temps, ce qui nous conforte dans notre hypothèse d'une grande constante d'association. La légère désorption (9%) observée peut provenir de la manipulation des capsules.

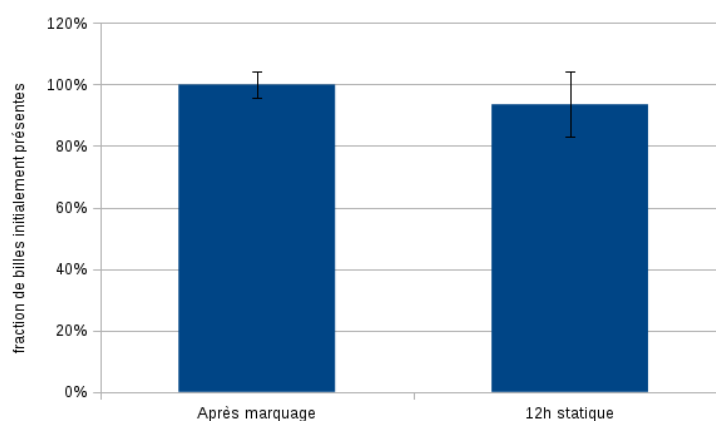


FIGURE 3.15 – Effet du temps sur la fraction de billes adsorbées sur les capsules. Nous constatons une légère désorption après 12 heures statique (9%), mais qui pourraient très bien être du à la manipulation des capsules.

Nous pouvons maintenant évaluer la robustesse du procédé. Il nous importe en effet de savoir si les colloïdes adsorbés sur les capsules se désorbent quand les capsules sont manipulées. Si une fraction trop importante desdits colloïdes se désorbent d'une capsule, cela met en péril la détermination correcte de l'histoire qu'a vécu la capsule considérée.

### Robustesse du procédé

Il est important de savoir si les billes se désorbent facilement de la surface des capsules, ou si au contraire elles restent adsorbées quand les capsules sont soumises à agitation ou sont manipulées. Nous avons donc étudié l'impact des manipulations et rinçages sur ces capsules.

Des capsules telles que celles montrées en figure 3.14 sont lavées à nouveau à trois reprises, puis sont pipetées d'un contenant à un autre. Un autre lot est soumis à une forte agitation (agitateur rotatif, dit « soleil ») pendant 12 heures. Elles sont ensuite imagées, comme présenté en figure 3.16. Si les manipulations provoquent une légère désorption des billes (17%), une forte agitation en retire plus de 90%.

Cet impact de l'agitation est un problème, car nous avons besoin d'homogénéiser le milieu lorsque l'on cultive des cellules. Il nous faut donc trouver des conditions dans lesquelles nous pouvons agiter sans désorber les billes. Nous avons donc testé d'autre manière d'agiter. Nous



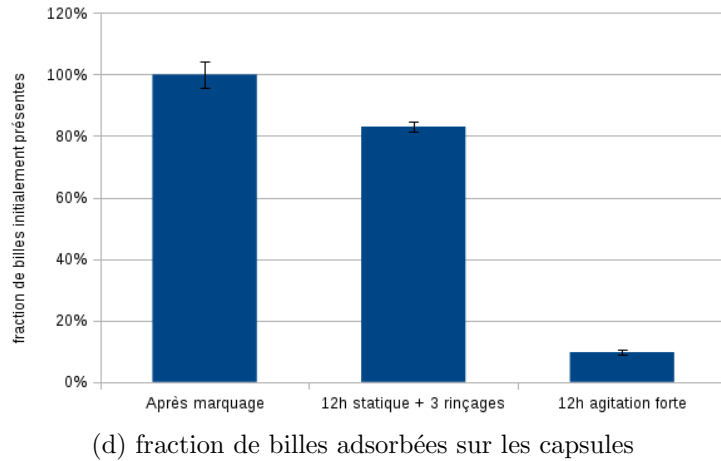
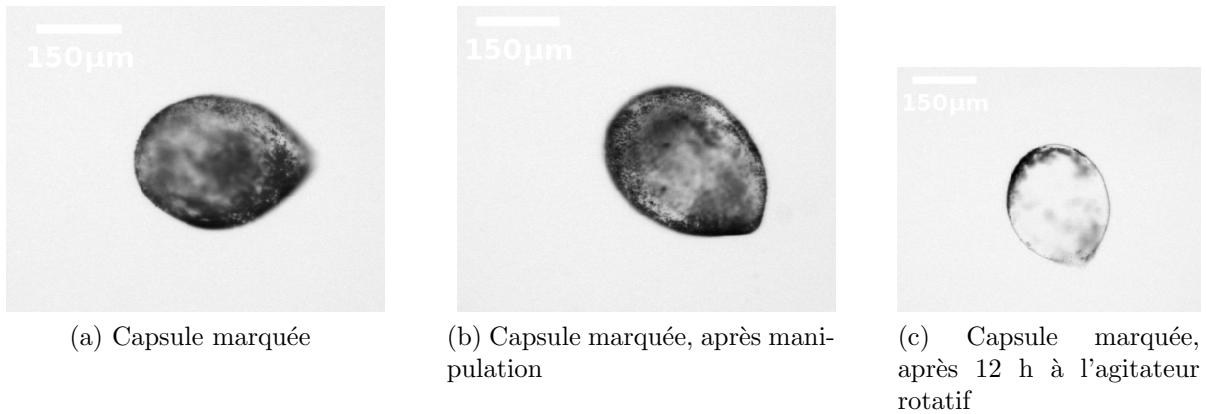


FIGURE 3.16 – Effet des rinçages sur les capsules marquées par des colloïdes (Dynabeads 1  $\mu\text{m}$  de diamètre). Nous ne constatons pas de désorption massive de billes suite aux manipulations (17%). Cependant une forte agitation en désorbe une majorité (plus de 90%).

avons aussi pris le parti d'utiliser des billes plus petites. Celles ci offrent en effet moins une moindre résistance au cisaillement provoqué par le fluide.

Nous recouvrons donc des capsules avec des billes de 200 nm de diamètre, en polymère, modifiées carboxyle. Ces billes sont séparées en deux lots. L'un est versé dans une boîte de Pétri, laquelle est placée sur un agitateur orbital. L'autre est mis dans un tube Eppendorf lequel est disposé sur un agitateur à rouleaux. 12 heures plus tard, les capsules sont imagées, et la DO est calculée. Les résultats sont présentés en figure 3.17. Avec ces appareils, les résultats sont acceptables : plus de 50% des billes restent adsorbées sur les capsules.

Nous avons donc une méthode efficace et relativement robuste pour adsorber des particules chargées négativement à la surface d'une bille d'alginate. Cette approche est générique et peut

## CONFIDENTIEL

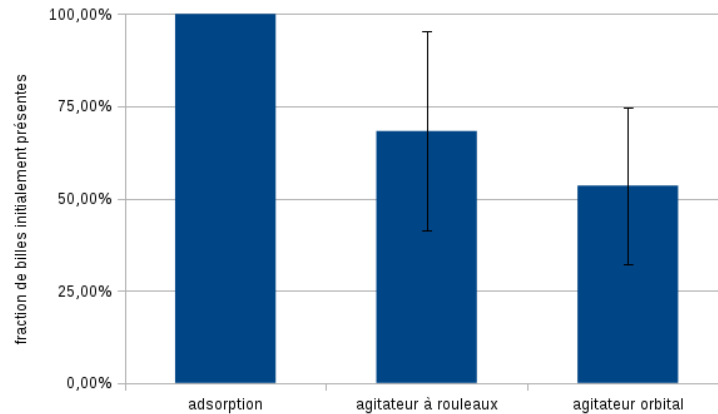


FIGURE 3.17 – Effet d’agitations sur la désorption des capsules. Il n’y a pas de différence significative entre les effets de l’agitateur à rouleaux et l’agitateur orbital. Dans les deux cas, plus de 50% des billes restent adsorbées (respectivement 68 et 53%). Il y a de grandes disparités entre les capsules d’un même lot.

être transposé à d’autres types de colloïdes. Nous pouvons maintenant passer au marquage avec les autres marqueurs envisagés, à savoir les quantum dots.

### 3.3.2 Utilisation de Quantum Dots

En nous basant sur ce qui a été dit précédemment, nous avons tenté plusieurs approches. Nous avons commencé par nous intéresser à l’utilisation de quantum dots (QD). Les propriétés des quantum dots en font en effet des particules très intéressantes pour le criblage.

#### Intérêts des Quantum Dots pour le criblage

Les quantum dots sont des nanocristaux semiconducteurs caractérisés par un large spectre d’excitation, un spectre d’émission fin, des pics d’émission ajustables, une longue durée de vie de photoluminescence et un photoblanchiment négligeable, et sont biocompatibles [103] [115]. Ces particules font typiquement une dizaine de nanomètres de diamètre.

Les QD présentent plusieurs avantages par rapport aux fluorophores classiques : leur spectre d’absorption est plus large, la longueur d’onde d’émission est ajustable (en jouant sur la taille du cristal), les spectres d’émissions sont bien plus fins et ne présentent pas d’épaule, et enfin le rendement quantique est supérieur. Ces avantages en font un outil puissant pour le multiplexage, ce qui est précisément ce qui nous intéresse.

Nous avons commencé le travail avec des QD dits « core », c’est à dire composés uniquement du cœur semi-conducteur et d’une couche de groupements carboxyles.

### Quantum Dot Emission & Absorption Spectra

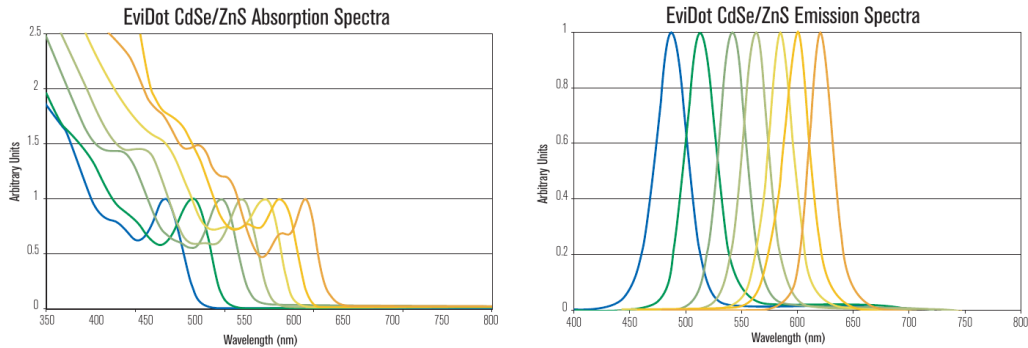


FIGURE 3.18 – Spectres d’absorption et d’émission de différents QD. On remarque l’absorption importante dans l’UV et les différents pics d’émissions bien résolus séparément. Crédits Evident Thermoelectrics.

### Quantum Dots « core »

Nous nous sommes procurés les QD suivants chez Sigma : 777951, dont le maximum d’émission est à 610 nm ; 777978, dont le maximum d’émission est à 710 nm. Nous commençons par vérifier si ces QD sont stables dans le milieu de culture.

Nous utilisons un lecteur de plaque TECAN M200 Pro. Dans une plaque 96 puits, nous préparons des puits contenant 2,5  $\mu\text{L}$  de suspension de QD et 200  $\mu\text{L}$  de MCCM. Pour chaque type de QD, la mesure est réalisée en triplicat. Les QD sont excités à 350 nm et la photoluminescence est observée respectivement à 610 et 710 nm. Un puit ne contenant que du MCCM sert à mesurer le blanc. L’intensité de photoluminescence émise est mesurée toute les demi-heures. Les données sont reportées en figure 3.19.

Ce graphique montre une dégradation importante des QD, puisqu’en moins de 7 heures l’intensité du signal de photoluminescence diminue de respectivement 99 et 92 % pour les QD émettant à 610 et 710 nm. Cela est en fait un problème connu avec des QD « core-type », comme ceux que nous utilisons. La présence d’ions, notamment Cuivre II [116], impacte fortement l’émission de lumière des QD.

Il est néanmoins possible de se procurer des QD core-shell, c’est-à-dire dont le cœur est protégé par une couche protectrice, typiquement en ZnS. Nous avons donc testé de tels QD.

### Quantum Dots « core-shell »

Nous nous sommes procurés des QD core-shell chez OceanNanotech. Ces QD (QSH-490 et QSH-620), sont protégés par une couche de ZnS. De même que les QD utilisés au paragraphe précédents, les QSH-490 et 620 présentent des groupements carboxyles.

CONFIDENTIEL

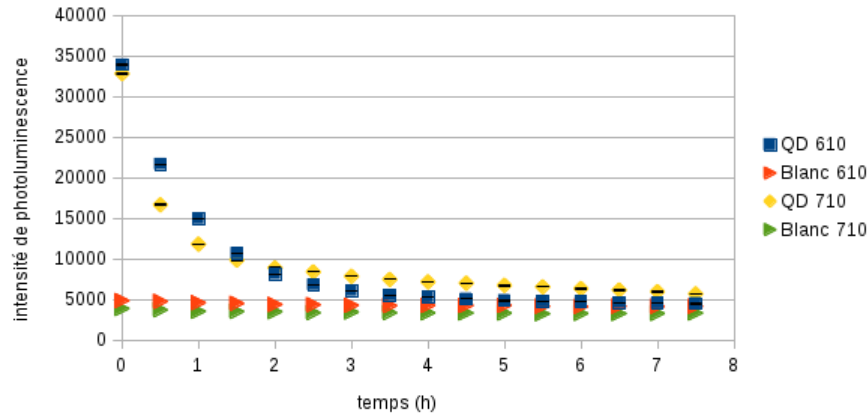


FIGURE 3.19 – Évolution de l'intensité de photoluminescence des QD core-type dans le MCCM. Au bout de 7 heures, l'intensité de photoluminescence a diminué de plus de 90%.

Nous utilisons à nouveau le TECAN M200 Pro pour mesurer l'évolution de l'intensité de photoluminescence. Dans une plaque 96 puits, nous préparons des puits contenant 2  $\mu$ L de suspension de QD et 200  $\mu$ L de MCCM. Pour chaque type de QD, la mesure est réalisée en triplicat. Les QD sont excités à 350 nm et la photoluminescence est observée respectivement à 490 et 620 nm. Un puit ne contenant que du MCCM sert à mesurer le blanc. L'intensité de photoluminescence émise est mesurée toute les demi-heures. Les données sont reportées en figure 3.19.

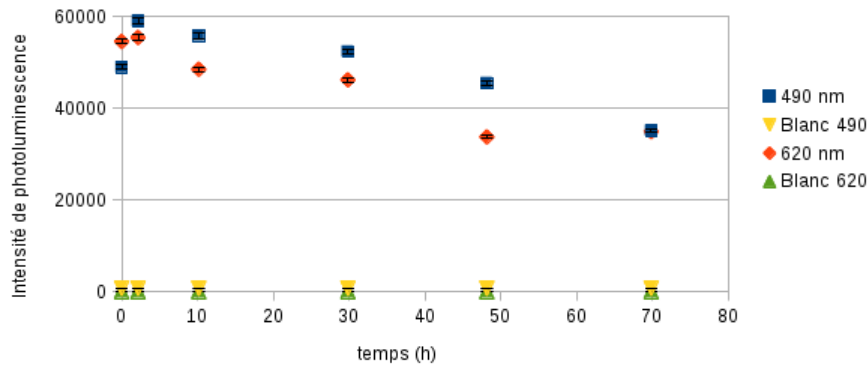


FIGURE 3.20 – Évolution de l'intensité de photoluminescence des QD QSH-490 et QSH-620. Après 72 heures, la perte d'intensité est respectivement de 28 et 36%, et le rapport signal sur bruit reste excellent (52 et 758).

Ces QD sont bien moins dégradés que les précédents. En 72 heures, la perte du signal n'est que de 28% pour les QSH-490 et 36 % pour les QSGH-620. Nous pouvons donc procéder à l'adsorption des QD sur des billes d'alginate.

Pour ce faire, nous recouvrons des billes d'alginate avec de la PLL, comme expliqué plus haut. 750 de ces billes sont placées dans 2,5 mL de MCCM, et 0,5  $\mu\text{L}$  d'une suspension de QSH-490 est ajoutée. Quinze minutes plus tard, les billes sont rincées deux fois avec du MCCM puis sont imagées à l'aide d'un microscope à photoluminescence. Les clichés sont montrés en figure 3.21.

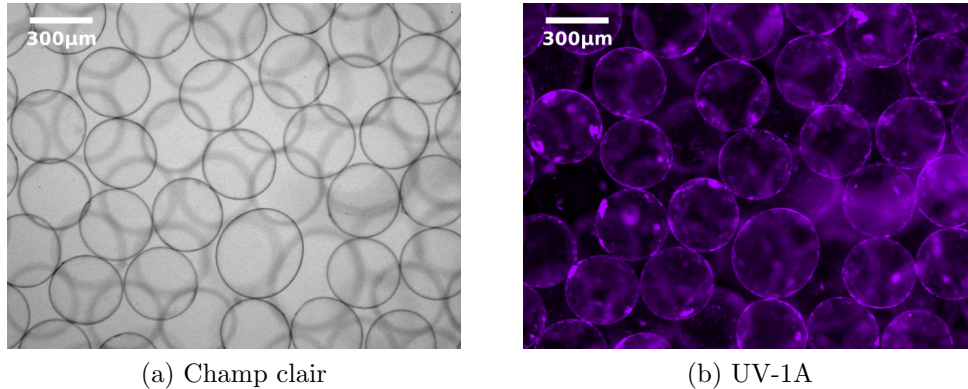


FIGURE 3.21 – Adsorption de QD QSH-490 sur des billes d'alginate.

Les QD s'adsorbent très bien sur les billes d'alginate. Nous constatons cependant une diminution de la photoluminescence émise par les billes marquées avec ces QD. Se pose alors la question d'une éventuelle interaction entre les QD et la PLL adsorbée sur les billes d'alginate. Il se pourrait aussi qu'un phénomène de désorption soit à l'œuvre, mais il nous est plus simple de vérifier d'abord la stabilité des QD lorsqu'ils sont en présence de PLL.

Pour ce faire, nous pipettons 200  $\mu\text{L}$  de MCCM additionné de  $10^{-3}\%$  de PLL dans les puits d'une plaque 96 puits. Nous ajoutons ensuite dans deux puits 2  $\mu\text{L}$  d'une suspension de QSH-490, et dans deux autres puits 2  $\mu\text{L}$  d'une suspension de QSH-620. Un autre puit sert de contrôle. L'émission de photoluminescence est ensuite suivie, et les résultats sont donnés en figure 3.22.

On constate une forte diminution de l'intensité de photoluminescence émise par les QD QSH-490 et QSH-620, respectivement de 72 et 80%. L'explication de ce phénomène nous a été fournie par le Professeur Nicolas Lequeux (Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux) : les ligands adsorbés sur la surface du QD sont très vraisemblablement échangés, partiellement ou totalement, par la PLL, ce qui modifie la photoluminescence. Des exemples de modifications de photoluminescence par échange de ligands sont rapportés dans la littérature[117]. Cette diminution de photoluminescence est trop importante pour que nous puissions nous en accommoder. Il nous est donc impossible d'utiliser de tels QD pour faire du criblage combinatoire.

Les QD, malgré leurs promesses, se sont malheureusement révélés inutilisables dans notre contexte. Soit les QD core-type sont dégradés par les ions en solution, soit les QD core-shell voient leur photoluminescence s'éteindre lorsqu'ils sont adsorbés sur une surface d'alginate

## CONFIDENTIEL

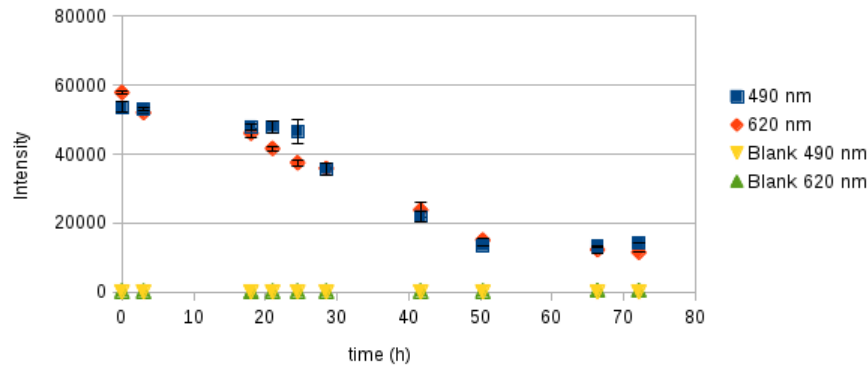


FIGURE 3.22 – Évolution de l'intensité de photoluminescence des QD QSH-490 et QSH-620 dans du MCCM additionné de  $10^{-3}\%$  de PLL. Au bout de 72 heures, l'intensité du signal diminue respectivement de 72 et 80 %.

recouverte de PLL. L'approche de l'utilisation de liaisons faibles pour réaliser le marquage de capsules reste valable. Dans ce cas très précis, les particules sont bloquantes. Nous nous sommes donc intéressés à une autre voie, en travaillant avec des fluorophores classiques encapsulés dans des particules.

### 3.3.3 Utilisation de particules de silice fluorescentes

La chimie de la silice est bien connue, de même que la synthèse de particules de silice contenant des fluorophores. Les fluorophores sont typiquement greffés à la surface des sphères de silice après synthèse des dites sphères. Ils peuvent être aussi greffés dans tout le volume [118], ce qui augmente significativement le signal de fluorescence. Nous nous sommes procurés de telles particules (Sicastar-F 1  $\mu\text{m}$ , Micromod).

#### Stabilité

Nous commençons par nous assurer de la stabilité de ces particules dans le milieu. Nous commençons par vérifier que ces particules se s'agrègent pas dans le MCCM, en utilisant le même protocole que précédemment. Les clichés sont présentés en figure 3.23. Par ailleurs, le potentiel Zeta de ces particules est mesuré et vaut  $-37,6$  mV.

Nous sommes assurés de la stabilité colloïdale de notre suspension. Nous pouvons maintenant nous préoccuper de la stabilité de la fluorescence dans les milieux, et en présence de PLL. Nous mesurons l'émission de fluorescence d'une suspension de Sicastar Green et Red dans du MCCM additionné de  $10^{-3}\%$  de PLL. Les résultats sont présentés en figure 3.24. L'intensité de fluorescence des Sicastar Green et Red augmente respectivement de 20,2 et 8,3%, ce que nous pouvons peut-être attribuer à la sédimentation des billes dans le puit. En tout état de cause, aucun impact majeur n'est à remarquer sur l'intensité de fluorescence.

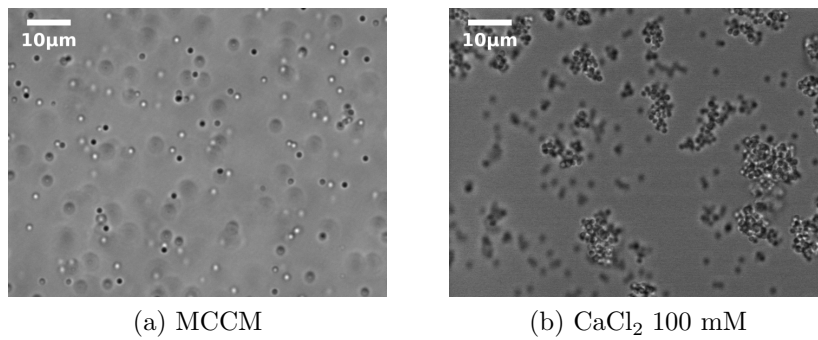


FIGURE 3.23 – Particules de silice Micromod 1 µm dans du MCCM et dans du CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Les particules ne s’agrègent pas dans le MCCM.

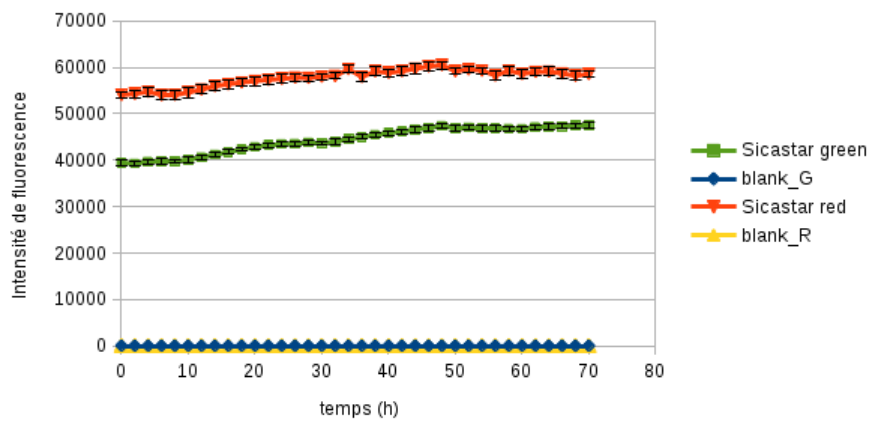


FIGURE 3.24 – Stabilité des particules de silice Micromod dans le MCCM additionné de 10<sup>-3</sup>% de PLL.

Nous pouvons donc maintenant passer à l’adsorption de ces particules sur les capsules.

### Adsorption de particules de silice fluorescentes et codage couleur

Nous allons maintenant adsorber ces particules fluorescentes de 1  $\mu\text{m}$  sur nos capsules préalablement recouvertes de PLL.

Pour cela, nous préparons 2 tubes Eppendorf contenant 500  $\mu\text{L}$  de HEPES-Ca et 290 capsules préalablement recouvertes de PLL. Puis,  $2,4 \times 10^{10}$  particules sont ajoutées, chaque tube correspond à une couleur. Les longueurs d'onde d'excitation/émission sont respectivement 485/510 nm et 569/585 nm pour les Sicastar-F Green et Red. Après 10 minutes d'incubation, les capsules sont lavées et imagées au microscope à fluorescence. Les clichés sont présentés en figure 3.25. Sans surprise, les particules s'adsorbent sur les capsules. De plus, la fluorescence des particules dans le rouge ou le vert permet de marquer les capsules de manière univoque.

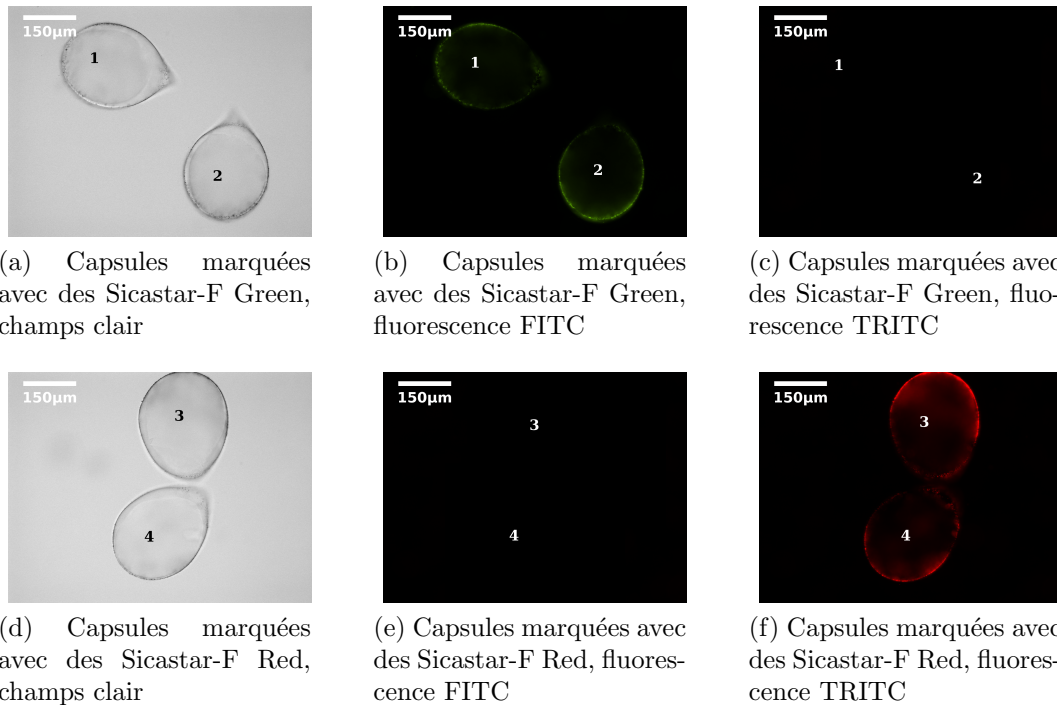


FIGURE 3.25 – Adsorption, sur deux populations de capsules, de deux types de particules de silice contenant chacun un fluorophore différent. Chacun fluorophore est identifiable sans équivoque, le marquage est univoque.

Nous pouvons enfin vérifier que ces marqueurs ne se déplacent pas d'une capsule à une autre. Ceci est un point important. En effet, si les marqueurs sont capables de passer d'une capsule à une autre, cela fausse le marquage et met en péril la détermination correcte de la séquence qu'a vécue la capsule.

Pour cela, deux populations de capsules sont marquées avec respectivement des Sicastar-F Green et des Sicastar-F Red. Les deux populations sont ensuite mélangées et l'ensemble est placé sur un microscope à fluorescence. Des clichés sont pris au temps initial et 12 heures après.



Les images sont présentées en figure 3.26. Nous montrons ainsi que les billes fluorescentes restent adsorbées de manière permanente sur les capsules, sans sauter d'une capsule à une autre.

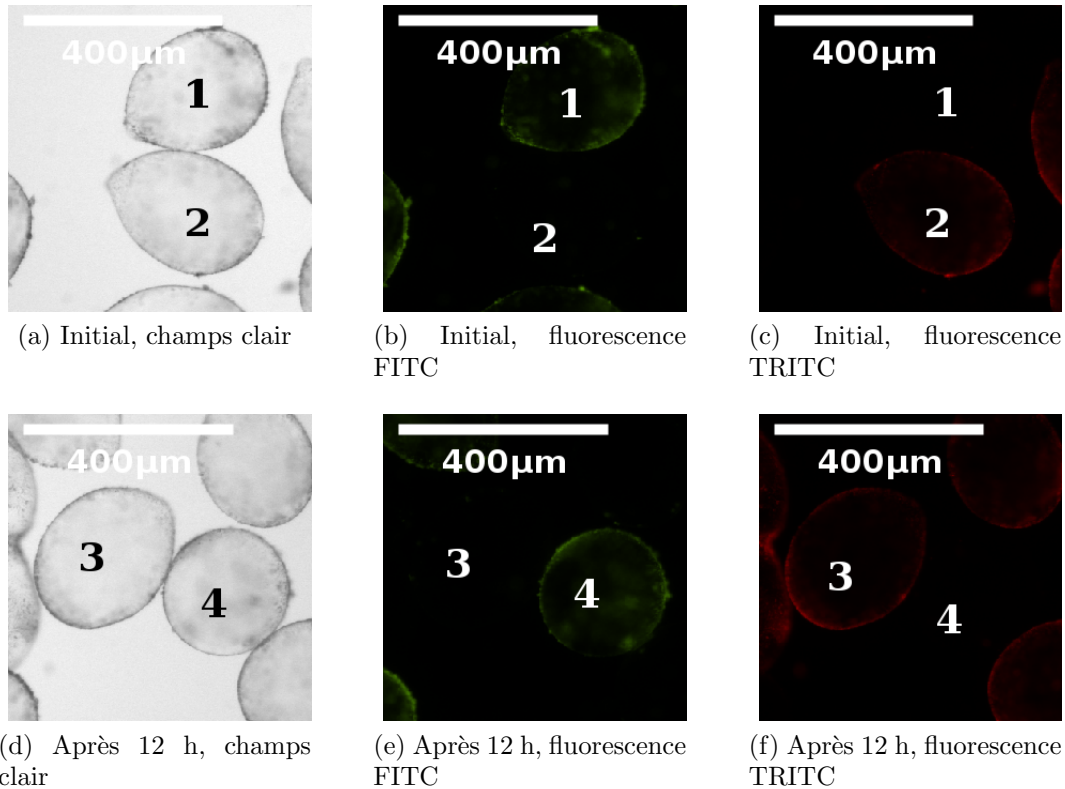


FIGURE 3.26 – Deux populations de capsules marquées chacune avec un fluorophore différent sont mélangées. Après 12h, les marqueurs ne se sont pas déplacés sur d'autres capsules. Nous pouvons ainsi mélanger plusieurs capsules portant des marqueurs différents sans que ceux-ci en soient affectés. Cela démontre la validité de l'approche.

Pour terminer cette preuve de concept, il nous reste à valider qu'il est possible d'adsorber deux marqueurs différents sur une capsule. Pour cela, une population de capsules est d'abord marquée avec des Micromod Green, le tout est rincé puis les capsules sont exposées à des Micromod Red. Les capsules sont ensuite imagées, les clichés sont présentés en figure 3.27. Nous terminons ainsi la preuve de concept du marquage avec des billes fluorescentes.

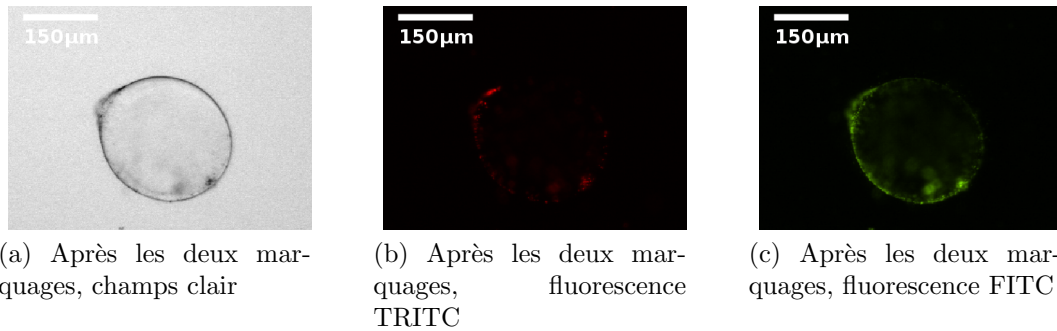


FIGURE 3.27 – Marquage d’une capsule avec deux fluorophores, successivement. On distingue les deux fluorophores, l’un sur le canal TRITC (Micromod Red), l’autre sur le canal FITC (Micromod Green).

## Conclusion

Nous avons montré la validité de notre approche. Celle-ci consiste à marquer des capsules avec des colloïdes en établissant des liaisons faibles entre les deux types d’objets. L’approche que nous avons explorée est générale et peut être utilisée avec une grande variété d’objets (particules magnétiques ou fluorescentes qu’à des quantum dots), ce qui en fait sa puissance. Elle est de plus relativement simple à mettre en œuvre et robuste.

Ce marquage impose néanmoins de traiter les capsules avec précaution, sous peine de désorber les colloïdes et de perdre ledit marquage.

Les fluorophores encapsulés se sont révélés des marqueurs convaincants. Le multiplexage avec de telles particules est une réalité, puisque la technologie Luminex xmap permet d’avoir accès à 500 marqueurs fluorescents différents. Les QD, malgré leurs nombreuses qualités intrinsèques, se sont montrés trop fragiles pour être utilisables dans notre contexte.

Nous n’avons malheureusement pas pu appliquer cette preuve de concept à un exemple réel faute de temps.

Cette preuve de concept peut être améliorée en montrant qu’il était possible de réaliser un codage en utilisant un seul type de colloïde et en faisant varier le nombre de colloïdes adsorbés.

## 3.4 Conclusion

Face à la problématique de criblage de séquences de conditions de culture, le criblage combinatoire est une approche pertinente mais qui présente des défis d’implémentation. Nous proposons une preuve de concept de marquage de capsules avec des colloïdes basé sur des interactions faibles. Cette approche est générale et versatile.

Les QDs, se sont avérés trop fragiles pour être utilisés dans un tel cas. Pour remédier à ce problème nous avons démarré une collaboration avec Nicolas Lequeux, qui possède un savoir-faire en encapsulation de quantum dots. Cela permettrait de protéger les QD dans une matrice, ce qui éviterait leur dégradation et les échanges de ligands.

## CONFIDENTIEL

D'autre part, pour éviter une désorption trop importante des colloïdes, nous pourrions nous intéresser aux dépôts de films de polymères sur la structure capsule-colloïdes. Cet angle d'attaque est tout à fait dans le savoir-faire du laboratoire.

Nous avons validé expérimentalement ou grâce à des références bibliographiques les différentes étapes de ce procédé de criblage de séquences de conditions de culture. Il ne reste plus qu'à assembler les différentes étapes pour obtenir un procédé puissant, qui a le potentiel d'apporter des avancées importantes dans l'élaboration de forçage physiologique, ou dans la compréhension des processus de différenciation des cellules souches [119] [100].

Il nous reste à aller au delà de la preuve de concept et à l'appliquer pour une application industrielle ou académique. Nous pensons qu'il serait intéressant de le faire avec un industriel ayant un besoin particulier et un savoir-faire adéquat ; ou de cribler les chemins de différenciation des cellules-souches humaines.

# Conclusion générale et perspectives

Les bioprocédés connaissent aujourd'hui un renouveau, portés par des exigences sociétales et des innovations technologiques. L'encapsulation dans des structures à cœur liquide est une innovation qui peut bénéficier pleinement aux bioprocédés.

Dans le chapitre introductif de ce manuscrit nous avons vu que les bioprocédés ont été supplantés par la chimie de synthèse lorsque cela était possible, pour des raisons de rendement, de coût, de purification, de fiabilité et de faisabilité industrielle. Cependant, certaines molécules ne sont à l'heure actuelle pas synthétisables, et seuls les bioprocédés permettent de les fabriquer. L'encapsulation en cosmétique permet de proposer des produits au visuel particulièrement innovant et attrayant. En culture cellulaire, elle permet de protéger des organismes au sein d'un véhicule qui les isole des contraintes extérieures ; de structurer les cellules et de contrôler leurs interactions ; et de pouvoir manipuler ces organismes plus simplement.

Les microalgues sont une source d'une grande diversité de molécules d'intérêt pour plusieurs thématiques, dont la cosmétique. Nous avons fait converger ces axes en proposant une encapsulation de microalgues afin de produire des molécules d'intérêt pour la cosmétique.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit est une étude de la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* en capsule. Nous avons mis en évidence l'absence d'impact négatif de l'encapsulation sur les microalgues. Au contraire, nous sommes capables de faire pousser des microalgues à des concentrations bien supérieures en capsule qu'en suspension classique, grâce à la diffusion de nutriments à travers la membrane semi-perméable de nos capsules. Nous avons ensuite mis au point un moyen innovant de décontaminer la phase continue en utilisant une molécule qui ne diffuse pas dans les capsules. Ainsi, l'action délétère de celle-ci s'exerce uniquement dans la phase continue et pas dans les capsules. Enfin, nous montrons que l'encapsulation n'a pas d'impact négatif sur la production de molécules d'intérêt sous élévation. Au contraire, les facilités de manipulation apportées par les capsules rendent le procédé plus simple.

Produire des molécules d'intérêt grâce à l'élévation implique de mettre au point une séquence de conditions de culture qui maximise le rendement de production. Ce type de criblage est un réel défi, du fait des nombres en jeu. Le criblage combinatoire est un moyen de faire du criblage de séquence de conditions de culture. Il nécessite cependant d'être capable de retracer l'histoire vécue par les cellules considérées. Les capsules sont ici tout à fait adaptées à cet usage. Elles permettent d'une part de manipuler facilement les cellules, et de l'autre de fixer des marqueurs qui nous permettent de retracer ladite histoire. Nous présentons une preuve de concept en utilisant des colloïdes comme marqueurs.

Ces travaux ont été menés dans le cadre d'une application cosmétique. Nous avons ouvert la

## CONFIDENTIEL

voie vers un produit cosmétique contenant des microalgues encapsulées. Nous avons démontré la validité et l'intérêt de trois concepts pour les bioprocédés : la culture et la production de molécules d'intérêt en capsule, la décontamination spécifique de la phase continue, et le criblage combinatoire en capsule. Notre approche est générique, et de fait ces concepts peuvent être appliqués avec succès de manière bien plus large, sur des thématiques appliquées ou fondamentales. Nous pouvons évoquer la fabrication pour la cosmétique de capsules contenant des microalgues ayant accumulé du sélénium, la production de protéines à haute valeur ajoutée par des cellules de mammifères encapsulées, ou encore l'étude de l'influence de différents facteurs sur le devenir des cellules souches.

# Annexe A

## Annexes

### A.1 Milieux de culture

#### A.1.1 TAP

Ce milieu de culture est fourni par l'IBPC. Il s'agit d'un milieu riche, contenant une source de carbone qui permet une culture en hétérotrophie.

#### Préparation

Plusieurs solutions mères sont préparées.

Phosphate Buffer 2X : 14,34 g de  $K_2HPO_4$ , 7,26 g de  $KH_2PO_4$ , eau distillée QSP 1L

Phosphate 1M pH 7 Buffer : 60 mL de  $K_2HPO_4$  1M + 40 mL de  $KH_2PO_4$  1M

Beijerincks 2x : 8 g de  $NH_4Cl$ , 1 g de  $CaCl_2$ , 2 g de  $MgSO_4$ , eau distillée QSP 1L

Hutner's trace elements : 50 g d'EDTA, 22,0 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 11,4 g de  $H_3BO_3$ , 5,06 g de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 4,99 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,16 g de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 1,57 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1,10 g de  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ; l'EDTA est dissout séparément dans 250 mL d'eau distillée, le  $ZnSO_4$  dans 100 mL d'eau distillée, le  $H_3BO_3$  dans 200 mL d'eau distillée et les autres éléments dans 50 mL d'eau distillée. Ces solutions sont mélangées, l'EDTA en dernier. Le mélange est porté à ébullition quelques minutes, le pH est ajusté à 6,5-6,8 avec une solution de KOH à 20%. Le volume du mélange est ensuite ajusté à 1 L en ajoutant de l'eau distillée. La solution est ensuite laissée à reposer jusqu'à devenir mauve/rose, puis elle est filtrée.

Le TAP peut enfin être préparé. 50 mL de Beijerincks (2x), 1 mL de Phosphate 1M pH7 Buffer, 1 mL de Hutner's trace elements, 1 mL d'acide acétique et 2,42 g de TRIS sont mélangés, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillé. Le pH est ajusté à 7,1-7,4 avec de la soude. La solution est filtrée à 0,2  $\mu m$  et conservée à 4°C.

CONFIDENTIEL

Composé	Concentration (mol/L)
TRIS	$2,00 \cdot 10^{-2}$
NH <sub>4</sub> Cl	$7,00 \cdot 10^{-3}$
MgSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$8,30 \cdot 10^{-4}$
CaCl <sub>2,2</sub> H <sub>2</sub> O	$4,50 \cdot 10^{-4}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$1,65 \cdot 10^{-3}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,05 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> EDTA <sub>,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,34 \cdot 10^{-4}$
ZnSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$1,36 \cdot 10^{-4}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,84 \cdot 10^{-4}$
MnCl <sub>2,4</sub> H <sub>2</sub> O	$4,00 \cdot 10^{-5}$
FeSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$3,29 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O	$1,23 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4,5</sub> H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-6}$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	$4,44 \cdot 10^{-6}$
acide acétique	$17,47 \cdot 10^{-3}$

TABLE A.1 – Composition du milieu TAP

## Composition

### A.1.2 Minimum

Ce milieu de culture est fourni par l'IBPC. Il ne contient pas de source de carbone et ne permet donc que la culture d'êtres photosynthétiques.

### Préparation

Les solutions-mères détaillées ci-dessus sont utilisées. Le Minimum est préparé en mélangeant 50 mL de Beijerincks (2x), 50 mL de Phosphate Buffer 2X, 1 mL de Hutner's trace elements, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillé. Le pH est ajusté à 7,1-7,4 avec de la soude. La solution est filtrée à 0,2 µm et conservée à 4°C.

## Composition

CONFIDENTIEL

Composé	Concentration (mol/L)
NH <sub>4</sub> Cl	7,00.10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	8,30.10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2,2</sub> H <sub>2</sub> O	4,50.10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,12.10 <sup>-3</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,67.10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA <sub>,2</sub> H <sub>2</sub> O	1,34.10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	1,36.10 <sup>-4</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,84.10 <sup>-4</sup>
MnCl <sub>2,4</sub> H <sub>2</sub> O	4,00.10 <sup>-5</sup>
FeSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	3,29.10 <sup>-5</sup>
CoCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O	1,23.10 <sup>-5</sup>
CuSO <sub>4,5</sub> H <sub>2</sub> O	1,00.10 <sup>-6</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	4,44.10 <sup>-6</sup>

TABLE A.2 – Composition du milieu Minimum

### A.1.3 NO

Ce milieu de culture est fourni par l'IBPC. Il s'agit d'un TAP sans azote, qui permet d'induire la production de lipides chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### Préparation

Une solution de Beijerincks N0 (2x) est préparée ainsi : 1 g de CaCl<sub>2</sub>, 2 g de MgSO<sub>4</sub>, eau distillée QSP 1L.

Le NO peut ensuite être préparé. 50 mL de Beijerincks NO (2x), 1 mL de Phosphate 1M pH7 Buffer, 1 mL de Hutner's trace elements, 1 mL d'acide acétique et 2,42 g de TRIS sont mélangés, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillé. Le pH est ajusté à 7,1-7,4 avec de la soude. La solution est conservé à 4°C.

#### Composition



CONFIDENTIEL

Composé	Concentration (mol/L)
TRIS	$2,00 \cdot 10^{-2}$
MgSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$8,30 \cdot 10^{-4}$
CaCl <sub>2,2</sub> H <sub>2</sub> O	$4,50 \cdot 10^{-4}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$1,65 \cdot 10^{-3}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,05 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> EDTA <sub>,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,34 \cdot 10^{-4}$
ZnSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$1,36 \cdot 10^{-4}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,84 \cdot 10^{-4}$
MnCl <sub>2,4</sub> H <sub>2</sub> O	$4,00 \cdot 10^{-5}$
FeSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$3,29 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O	$1,23 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4,5</sub> H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-6}$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	$4,44 \cdot 10^{-6}$
acide acétique	$17,47 \cdot 10^{-3}$

TABLE A.3 – Composition du milieu N0

#### A.1.4 RCCM

Ce milieu de culture (Rich Capsule Compatible Medium) est fabriqué au laboratoire. Comme son nom l'indique, il est compatible avec notre technologie d'encapsulation.

#### Préparation

Les solutions mères listées ci dessus sont utilisées ; on prépare de plus une solution de CaCl<sub>2</sub> à 100 mM.

50 mL de Beijerincks (2x), 1 mL de Phosphate 1M pH7 Buffer, 1 mL de Hutner's trace elements, 1 mL d'acide acétique, 10 mL de la solution de CaCl<sub>2</sub> et 5,96 g d'HEPES sont mélangés, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillé. Le pH est ensuite ajusté à 7,1-7,4 avec une solution de NaOH à 8 M. La solution est filtrée à 0,2 µm et conservée à 4°C.

#### Composition

CONFIDENTIEL

Composé	Concentration (mol/L)
HEPES	$25,00 \cdot 10^{-3}$
NH <sub>4</sub> Cl	$7,00 \cdot 10^{-3}$
MgSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$8,30 \cdot 10^{-4}$
CaCl <sub>2,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,45 \cdot 10^{-3}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$1,65 \cdot 10^{-3}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,05 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> EDTA <sub>,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,34 \cdot 10^{-4}$
ZnSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$1,36 \cdot 10^{-4}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,84 \cdot 10^{-4}$
MnCl <sub>2,4</sub> H <sub>2</sub> O	$4,00 \cdot 10^{-5}$
FeSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$3,29 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O	$1,23 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4,5</sub> H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-6}$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	$4,44 \cdot 10^{-6}$
acide acétique	$17,47 \cdot 10^{-3}$

TABLE A.4 – Composition du milieu RCCM

### A.1.5 MCCM

Ce milieu de culture (Minimum Capsule Compatible Medium) est fabriqué au laboratoire.

#### Préparation

Les solutions mères listées ci dessus sont utilisées.

50 mL de Beijerincks (2x), 1 mL de Phosphate 1M pH7 Buffer, 1 mL de Hutner's trace elements, 10 mL de la solution de CaCl<sub>2</sub> et 5,96 g d'HEPES sont mélangés, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillé. Le pH est ensuite ajusté à 7,1-7,4 avec une solution de NaOH à 8 M. La solution est filtrée à 0,2 µm et conservée à 4°C.

#### Composition

CONFIDENTIEL

Composé	Concentration (mol/L)
HEPES	$25,00 \cdot 10^{-3}$
NH <sub>4</sub> Cl	$7,00 \cdot 10^{-3}$
MgSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$8,30 \cdot 10^{-4}$
CaCl <sub>2,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,45 \cdot 10^{-3}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$1,65 \cdot 10^{-3}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,05 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> EDTA <sub>,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,34 \cdot 10^{-4}$
ZnSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$1,36 \cdot 10^{-4}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,84 \cdot 10^{-4}$
MnCl <sub>2,4</sub> H <sub>2</sub> O	$4,00 \cdot 10^{-5}$
FeSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$3,29 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O	$1,23 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4,5</sub> H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-6}$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	$4,44 \cdot 10^{-6}$

TABLE A.5 – Composition du milieu MCCM

### A.1.6 N0CCM

Ce milieu de culture (Rich Capsule Compatible Medium) est fabriqué au laboratoire. Comme son nom l'indique, il est compatible avec notre technologie d'encapsulation. Il ne contient pas d'azote, qui permet d'induire la production de lipides chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### Préparation

Les solutions mères listées ci dessus sont utilisées.

50 mL de Beijerincks N0 (2x), 1 mL de Phosphate 1M pH7 Buffer, 1 mL de Hutner's trace elements, 1 mL d'acide acétique, 10 mL de la solution de CaCl<sub>2</sub> et 5,96 g d'HEPES sont mélangés, et le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau distillé. Le pH est ensuite ajusté à 7,1-7,4 avec une solution de NaOH à 8 M. La solution est filtrée à 0,2 µm et conservée à 4°C.

#### Composition

CONFIDENTIEL

Composé	Concentration (mol/L)
HEPES	$25,00 \cdot 10^{-3}$
MgSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$8,30 \cdot 10^{-4}$
CaCl <sub>2,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,45 \cdot 10^{-3}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$1,65 \cdot 10^{-3}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,05 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> EDTA <sub>,2</sub> H <sub>2</sub> O	$1,34 \cdot 10^{-4}$
ZnSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$1,36 \cdot 10^{-4}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,84 \cdot 10^{-4}$
MnCl <sub>2,4</sub> H <sub>2</sub> O	$4,00 \cdot 10^{-5}$
FeSO <sub>4,7</sub> H <sub>2</sub> O	$3,29 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2,6</sub> H <sub>2</sub> O	$1,23 \cdot 10^{-5}$
CuSO <sub>4,5</sub> H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-6}$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	$4,44 \cdot 10^{-6}$
acide acétique	$17,47 \cdot 10^{-3}$

TABLE A.6 – Composition du milieu N0CCM

# Bibliographie

- [1] Joseph Boudrant, Jean Guezennec, and Pierre Monsan. *Techniques de l'ingénieur. Bio-procédés*. Paris, 2007.
- [2] Laurent Bouby, Philippe Boissinot, and Philippe Marival. Never Mind the Bottle. Archaeobotanical Evidence of Beer-brewing in Mediterranean France and the Consumption of Alcoholic Beverages During the 5th Century BC. *Human Ecology*, 39(3) :351–360, 2011.
- [3] Losee L Ling, Tanja Schneider, Aaron J Peoples, Amy L Spoering, Ina Engels, Brian P Conlon, Anna Mueller, Dallas E Hughes, Slava Epstein, Michael Jones, Linos Lazarides, Victoria a Steadman, Douglas R Cohen, Cintia R Felix, K Ashley Fetterman, William P Millett, Anthony G Nitti, Ashley M Zullo, Chao Chen, and Kim Lewis. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535) :455–459, 2015.
- [4] Armand Notter. Difficultés d ' industrialisation de la pénicilline ( 1928-1942 ). *Histoire*, pages 31–38, 1990.
- [5] Romeo Radman, Teresa Saez, Christopher Bucke, and Tajalli Keshavarz. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37 :91–102, 2003.
- [6] Kari Skjånes, Céline Rebours, and Peter Lindblad. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(January 2012) :1–44, 2012.
- [7] Leslie Rolland. *Physico-chemical features of hydrogel capsules having a liquid core Propriétés physico-chimiques de capsules d ' hydrogel à cœur liquide*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2013.
- [8] Leslie Rolland, Enric Santanach-Carreras, Thomas Delmas, Jérôme Bibette, and Nicolas Bremond. Physicochemical properties of aqueous core hydrogel capsules. *Soft matter*, 10(48) :9668–74, nov 2014.
- [9] Nicola C. Hunt and Liam M. Grover. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnology Letters*, 32(6) :733–742, 2010.
- [10] S Hertzberg and A Jensen. Studies of alginate-immobilized marine microalgae. *Botanica Marina*, 32(4) :267–274, 1989.
- [11] M S Abdel Hameed. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *African Journal of Biotechnology*, 6(May) :1185–1191, 2007.

## CONFIDENTIEL

- [12] Jyothi Kaparapu. Micro algal Immobilization Techniques. *Micro algal Immobilization Techniques*, 8(1) :64–70, 2017.
- [13] Yannis Ferro, Mercedes Perullini, Matias Jobbagy, Sara A. Bilmes, and Claude Durrieu. Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. *Sensors (Switzerland)*, 12(12) :16879–16891, 2012.
- [14] Hugo Doméjean. *Formation of hydrogel aqueous-core capsules via the fragmentation of a compound complex fluid jet*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014.
- [15] Alvin a Carlos, Brett K Baillie, Masanobu Kawachi, and Tadashi Maruyama. Phylogenetic position of Symbiodinium (Dinophyceae) from Tridacnids (Bivalvia), Cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft Coral (Anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology*, 35(5) :1054–1062, 1999.
- [16] Virginia M. Weis, Wendy S. Reynolds, Melissa D. DeBoer, and Dave A. Krupp. Host-symbiont specificity during onset of symbiosis between the dinoflagellates Symbiodinium spp. and planula larvae of the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Coral Reefs*, 20(3) :301–308, 2001.
- [17] Diana Astorga, Javier Ruiz, and Laura Prieto. Ecological aspects of early life stages of *Cotylorhiza tuberculata* (Scyphozoa : Rhizostomae) affecting its pelagic population success. *Hydrobiologia*, 690(1) :141–155, 2012.
- [18] Johan Decelle, Raffaele Siano, Ian Probert, Camille Poirier, and Fabrice Not. Multiple microalgal partners in symbiosis with the acantharian *Acanthochiasma* sp. (Radiolaria). *Symbiosis*, 58(1-3) :233–244, 2012.
- [19] Milla Suutari, Markus Majaneva, David P Fewer, Bryson Voirin, Annette Aiello, Thomas Friedl, Adriano G Chiarello, and Jaanika Blomster. Molecular evidence for a diverse green algal community growing in the hair of sloths and a specific association with *Trichophilus welckeri* (Chlorophyta, Ulvophyceae). *BMC evolutionary biology*, 10 :86, 2010.
- [20] Carla A. Santos and Alberto Reis. Microalgal symbiosis in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13) :5839–5846, 2014.
- [21] Pauline Spolaore, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, and Arsène Isambert. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2) :87–96, feb 2006.
- [22] Julian N. Rosenberg, George A. Oyler, Loy Wilkinson, and Michael J. Betenbaugh. A green light for engineered algae : redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5) :430–436, 2008.
- [23] Armin Hallmann and a Hallman. Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant J*, 1(1) :81–98, 2007.
- [24] J Person. Livre Turquoise - Algues, Filière du Future. *Actes du Colloque Adebiotech 17-19 Novembre 2010, Romainville.*, 2011.
- [25] France Thevenieau and Jean-Marc Nicaud. Microorganisms as sources of oils. *Ocl*, 20(6) :D603, 2013.

- [26] Zih R. Huang, Yin K. Lin, and Jia Y. Fang. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds : Potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14(1) :540–554, 2009.
- [27] Kalpa Samarakoon and You Jin Jeon. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. *Food Research International*, 48(2) :948–960, oct 2012.
- [28] Brian Duval, Kalidas Shetty, and William H. Thomas. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*, 11(6) :559–566, 1999.
- [29] Hui Min David Wang, Ching Chun Chen, Pauline Huynh, and Jo Shu Chang. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184 :355–362, 2015.
- [30] Shima P. Damodaran, Stephan Eberhard, Laurent Boitard, Jairo Garnica Rodriguez, Yuxing Wang, Nicolas Bremond, Jean Baudry, Jérôme Bibette, and Francis André Wollman. A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE*, 10(3) :e0118987, 2015.
- [31] Elizabeth H. Harris. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Second edi edition, 1989.
- [32] Sabeeha S Merchant, Simon E Prochnik, Olivier Vallon, Elizabeth H Harris, J Karpowicz, George B Witman, Astrid Terry, Asaf Salamov, Lillian K Fritz-laylin, Laurence Maréchal-drouard, Wallace F Marshall, Liang-hu Qu, David R Nelson, a Sanderfoot, Martin H Spalding, Vladimir V Kapitonov, Qinghu Ren, Pierre Cardol, Heriberto Cerutti, Guillaume Chanfreau, Patrick Ferris, Hideya Fukuzawa, David González-ballester, Bernd Mueller-roeber, Sathish Rajamani, Richard T Sayre, Inna Dubchak, David Goodstein, Leila Hornick, Y Wayne Huang, Yigong Luo, Diego Martínez, Wing Chi, Abby Ngau, Bobby Otilar, Aaron Porter, Lukasz Szajkowski, Gregory Werner, Kemin Zhou, V Igor, Daniel S Rokhsar, and Arthur R Grossman. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318(5848) :245–250, 2010.
- [33] J W Young, J C Locke, A Altinok, N Rosenfeld, T Bacarian, P S Swain, E Mjolsness, and M B Elowitz. Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy. *Nature protocols*, 7(1) :80–88, jan 2012.
- [34] S. C. Agrawal. Factors controlling induction of reproduction in algae-review : The text. *Folia Microbiologica*, 57(5) :387–407, sep 2012.
- [35] James A. Gregory, Fengwu Li, Lauren M. Tomosada, Chesa J. Cox, Aaron B. Topol, Joseph M. Vinetz, and Stephen Mayfield. Algae-produced pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS ONE*, 7(5) :1–10, 2012.
- [36] I. A J Dreesen, G. C E Hamri, and Martin Fussenegger. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Biotechnology*, 145(3) :273–280, 2010.
- [37] Olivia C. Demurtas, Silvia Massa, Paola Ferrante, Aldo Venuti, Rosella Franconi, and Giovanni Giuliano. A *Chlamydomonas*-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. *PLoS ONE*, 8(4) :1–9, 2013.

CONFIDENTIEL

- [38] Stephen P Mayfield, Scott E Franklin, and Richard a Lerner. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2) :438–42, 2003.
- [39] Miller Tran, Bin Zhou, Pär L. Pettersson, Maria J. Gonzalez, and Stephen P. Mayfield. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(4) :663–673, 2009.
- [40] Bechth a Rasala and Stephen P Mayfield. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics (chholoplast). *Bioengineered bugs*, 2(1) :50–4, 2010.
- [41] Jürgen Voigt and Petra Münzner. The *Chlamydomonas* cell cycle is regulated by a light/dark-responsive cell-cycle switch. *Planta*, 172(4) :463–472, 1987.
- [42] LAURA BARSANTI and PAOLO GUALTIERI. *Algae : Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 2014.
- [43] Hosni Takache, Jérémy Pruvost, and Hélène Marec. Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Research*, 8 :192–204, 2015.
- [44] D S Gorman and R P Levine. Cytochrome f and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54 :1665–1669, 1965.
- [45] Giuliana D’Ippolito, Angela Sardo, Debora Paris, Filomena Monica Vella, Maria Grazia Adelfi, Pierpaolo Botte, Carmela Gallo, and Angelo Fontana. Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnology for biofuels*, 8(1) :28, 2015.
- [46] Beat B. Fischer, Manuela Wiesendanger, and Rik I L Eggen. Growth condition-dependent sensitivity, photodamage and stress response of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to high light conditions. *Plant and Cell Physiology*, 47(8) :1135–1145, 2006.
- [47] Jesse B Therien, Oleg a Zadvornyy, Matthew C Posewitz, Donald a Bryant, and John W Peters. Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Biotechnology for biofuels*, 7(1) :154, 2014.
- [48] Léopold Mottet. *Conducting composite hydrogel for the encapsulation of electroactive bacteria*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015.
- [49] Kévin Alessandri, Bibhu Ranjan Sarangi, Vasily Valériévitch Gurchenkov, Bidisha Sinha, Tobias Reinhold Kießling, Luc Fetler, Felix Rico, Simon Scheuring, Christophe Lamaze, Anthony Simon, Sara Geraldo, Danijela Vignjevic, Hugo Doméjean, Leslie Rolland, Anette Funfak, Jérôme Bibette, Nicolas Bremond, and Pierre Nassoy. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37) :14843–8, sep 2013.
- [50] Craig F. Bohren, Donald R. Huffman, and Bohren ;Craig F. ; Donald R. ; Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. 1983.



- [51] Anne G Glaesener, Sabeeha S Merchant, and Crysten E Blaby-Haas. Iron economy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in plant science*, 4(September) :337, 2013.
- [52] Do Yup Lee and Oliver Fiehn. High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant methods*, 4 :7, 2008.
- [53] Chaoming Song, Ping Wang, and Hernán a. Makse. A phase diagram for jammed matter. *Nature*, 453(7195) :629–632, 2008.
- [54] Roberto C. Gallo-Villanueva, Nadia M. Jesús-Pérez, José I. Martínez-López, Adriana Pacheco, and Blanca H. Lapizco-Encinas. Assessment of microalgae viability employing insulator-based dielectrophoresis. *Microfluidics and Nanofluidics*, 10(6) :1305–1315, 2011.
- [55] Quentin Béchet, Ivan Feurgard, Benoit Guieysse, and Filipa Lopes. The colorimetric assay of viability for algae (CAVA) : a fast and accurate technique. *Journal of Applied Phycology*, 27(6) :2289–2297, 2015.
- [56] Mia K. Steinberg, Edward J. Lemieux, and Lisa A. Drake. Determining the viability of marine protists using a combination of vital, fluorescent stains. *Marine Biology*, 158(6) :1431–1437, 2011.
- [57] M Sato, Y Murata, M Mizusawa, H Iwahashi, and S-i Oka. A simple and rapid dual-fluorescence viability assay for microalgae. *Microbiol Cult Coll*, 20(2) :53–59, 2004.
- [58] Zong Ming Xiu, Qing Bo Zhang, Hema L. Puppala, Vicki L. Colvin, and Pedro J J Alvarez. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*, 12(8) :4271–4275, 2012.
- [59] Mihai Onofrei, Jacquelyn Hunt, Joseph Siemieniczuk, Daniel R. Touchette, and Blackford Middleton. A first step towards translating evidence into practice : Heart failure in a community practice-based research network. *Informatics in Primary Care*, 12(3) :139–145, 2004.
- [60] C Lee Ventola. The antibiotic resistance crisis : part 2 : management strategies and new agents. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(5) :344–52, 2015.
- [61] S Shima, H Matsuoka, T Iwamoto, and H Sakai. Antimicrobial Action of E-Poly-L-Lysine. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 37(11) :1449, 1984.
- [62] Liming Zhang, Ruichao Li, Feng Dong, Aiyong Tian, Zhengjun Li, and Yujie Dai. Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with  $\epsilon$ -poly-l-lysine. *Food Chemistry*, 166 :107–114, 2015.
- [63] A.H Chheda and M.R. Vernekar. A natural preservative  $\epsilon$ -poly-L-lysine : fermentative production and applications in food industry. *International Food Research Journal*, 22(1) :23–30, 2015.
- [64] Paul F. Luckham and Jacob Klein. Forces between mica surfaces bearing adsorbed polyelectrolyte, poly-L-lysine, in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1*, 80(4) :865, 1984.
- [65] J. S. Jellinek. *Formulation and Function of Cosmetics*. 1970.

CONFIDENTIEL

- [66] Sarah E. Ruffell, Laurie M. Carreiro, and Kirsten M. Müller. Choosing the Right Microalgae for the Job. *Cosmetics and toiletries*, 2016.
- [67] Pierre Calleja and Marina Leterrier. Souche d’algues modifiée et procédé d’accumulation de triglycérides au moyen de ladite souche, 2016.
- [68] Yusuf Chisti. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3) :126–131, 2008.
- [69] Benjamin Moutel, Olivier Gonçalves, Fabienne Le Grand, Marc Long, Philippe Soudant, Jack Legrand, Dominique Grizeau, and Jérémy Pruvost. Development of a screening procedure for the characterization of *Botryococcus braunii* strains for biofuel application. *Process Biochemistry*, 2015.
- [70] Béatrice Perrier, Christelle Crampon, Olivier Guézet, Coralie Simon, François Maire, Olivier Lépine, Jérémy Pruvost, Paul Lozano, Olivier Bernard, and Elisabeth Badens. Production of a methyl ester from the microalgae *Nannochloropsis* grown in raceways on the French west coast. *Fuel*, 153 :640–649, 2015.
- [71] Jae Yon Lee, Chan Yoo, So Young Jun, Chi Yong Ahn, and Hee Mock Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101(1 SUPPL.) :S75—7, jan 2010.
- [72] Judith T. Cirulis, Bridget C. Strasser, John A. Scott, and Gregory M. Ross. Optimization of staining conditions for microalgae with three lipophilic dyes to reduce precipitation and fluorescence variability. *Cytometry Part A*, 81 A(7) :618–626, jul 2012.
- [73] Liam Brennan, Alfonso Blanco Fernández, Anika S. Mostaert, and Philip Owende. Enhancement of BODIPY 505/515 lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. *Journal of Microbiological Methods*, 90(2) :137–143, aug 2012.
- [74] Yuchi Han, Qinxue Wen, Zhiqiang Chen, and Pengfei Li. Review of methods used for microalgal lipid-content analysis. *Energy Procedia*, 12 :944–950, 2011.
- [75] Kazufumi Hosoda, Shingo Suzuki, Yoshinori Yamauchi, Yasunori Shiroguchi, Akiko Kashiwagi, Naoaki Ono, Kotaro Mori, and Tetsuya Yomo. Cooperative adaptation to establishment of a synthetic bacterial mutualism. *PLoS ONE*, 6(2), 2011.
- [76] Anthony Lubiniecki. *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*. 1990.
- [77] Hansjorg Hauser and Roland Wagner. *Mammalian cell biotechnology in protein production*. 1997.
- [78] S S Ozturk. Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology*, 22(1-3) :3–16, 1996.
- [79] Yusuf Chisti. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 18(10) :420–432, 2000.
- [80] M Jordan, H M Eppenberger, H Sucker, F Widmer, and A Einsele. Interactions between animal cells and gas bubbles : The influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(6) :446–454, 1994.

- [81] Jianyong Wu and Mattheus F A Goosen. Bubbles in Sparged Animal Cell Culture Bioreactors. 0229(94), 1995.
- [82] Pierre Le-Clech, Vicki Chen, and Tony A G Fane. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2) :17–53, nov 2006.
- [83] E. DULIEGE, T. Delmas, S. BARDON, J. Bibette, N. Bremond, and H. DOMEJEAN. Gel capsule comprising a plant cell, 2016.
- [84] Van Thang Duong, Yan Li, Ekaterina Nowak, and Peer M. Schenk. Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. *Energies*, 5(6) :1835–1849, 2012.
- [85] Yu Luen Deng, Jo Shu Chang, and Yi Je Juang. Separation of microalgae with different lipid contents by dielectrophoresis. *Bioresource Technology*, 135 :137–141, 2013.
- [86] Jaoon Young Hwan Kim, Ho Seok Kwak, Young Joon Sung, Hong Il Choi, Min Eui Hong, Hyun Seok Lim, Jae-Hyeok Lee, Sang Yup Lee, and Sang Jun Sim. Microfluidic high-throughput selection of microalgal strains with superior photosynthetic productivity using competitive phototaxis. *Scientific reports*, 6(November 2015) :21155, 2016.
- [87] Arum Han, Huijie Hou, Lei Li, Hyun Soo Kim, and Paul de Figueiredo. Microfabricated devices in microbial bioenergy sciences. *Trends in Biotechnology*, 31(4) :225–232, 2013.
- [88] Yi Je Juang and Jo Shu Chang. Applications of microfluidics in microalgae biotechnology : A review. *Biotechnology Journal*, 11(3) :327–335, 2016.
- [89] Hyun Soo Kim, Taylor L Weiss, Hem R Thapa, Timothy P Devarenne, and Arum Han. A microfluidic photobioreactor array demonstrating high-throughput screening for microalgal oil production. *Lab on a chip*, 14(8) :1415–25, apr 2014.
- [90] Mibelle Biochemistry Group. Snow Algae Powder - The Mystery of Red Snow. In *in-cosmetics Preview*.
- [91] R. B. Merrifield. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14) :2149, 1963.
- [92] Paul Edwards. Combinatorial chemistry. *Drug Discovery Today*, 5(12) :572–573, 2000.
- [93] Anas Rasheed and Rumana. Farhat. Combinatorial chemistry : a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(7) :2502–2516, 15 pp., 2013.
- [94] H M Geysen, R H Meloen, and S J Barteling. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(13) :3998–4002, 1984.
- [95] Edmund J Moran, Sepehr Sarshar, John F Cargill, Manouchehr M Shahbaz, Anna Lio, Adnan M M Mjalli, and Robert W Armstrong. Radio Frequency Tag Encoded Combinatorial Library Method for the Discovery of Tripeptide-Substituted Cinnamic Acid Inhibitors of the Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B. *Journal of the American Chemical Society*, 117(43) :10787–10788, 1995.
- [96] K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, Agnieszka Kaczor, and M. Baranska. Raman spectroscopy of lipids : A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(1) :4–20, 2015.

- [97] Marina Tarunina, Diana Hernandez, Christopher J. Johnson, Stanislav Rybtsov, Vidya Ramathas, Mylvaganam Jeyakumar, Thomas Watson, Lilian Hook, Alexander Medvinsky, Chris Mason, and Yen Choo. Directed differentiation of embryonic stem cells using a bead-based combinatorial screening method. *PLoS ONE*, 9(9) :e104301, jan 2014.
- [98] Y. Choo, F. Hornby, and J. Girdleston. Method for Determining the Cell Culture History of a Cell Unit, 2009.
- [99] Rasheena Edmondson, Jessica Jenkins Broglie, Audrey F Adcock, and Liju Yang. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 12(4) :207–18, 2014.
- [100] Yen Choo. Use of Combinatorial Screening to Discover Protocols That Effectively Direct the Differentiation of Stem Cells. In *Stem Cell Research and Therapeutics*, pages 227–250. 2008.
- [101] S. Freiberg and X. X. Zhu. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2) :1–18, 2004.
- [102] Anita Giglio, Silvia Battistella, Federica Fabia Talarico, Tullia Zetto Brandmayr, and Piero Giulio Giulianini. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae) : Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. *Micron*, 39(5) :552–558, 2008.
- [103] Margarida M Barroso. Quantum dots in cell biology. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(3) :237–251, 2011.
- [104] Otto S Wolfbeis. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev.*, 44(44) :4743–4768, 2015.
- [105] Allison Doerr. Multiplexing to the max. *Nature Methods*, 4(5) :381–381, 2007.
- [106] Nicolas Weibel. *Marqueurs Luminescents à Base d ' Ions Lanthanides : Synthèse , Propriétés et Marquage de Protéines* . PhD thesis, 2005.
- [107] Karen A Sap and Jeroen A A Demmers. Labeling Methods in Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics. *Integrative Proteomics*, pages 111–132, 2012.
- [108] Andrew Thompson, Jürgen Schäfer, Karsten Kuhn, Stefan Kienle, Josef Schwarz, Günter Schmidt, Thomas Neumann, and Christian Hamon. Tandem mass tags : A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(8) :1895–1904, 2003.
- [109] Daniel J. Schlingman, Andrew H. Hack, Simon G.J. Mochrie, and Lynne Regan. A new method for covalent attachment of DNA to a surface for single molecule studies. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 83(1) :91–95, 2011.
- [110] Allon M. Klein, Linas Mazutis, Ilke Akartuna, Naren Tallapragada, Adrian Veres, Victor Li, Leonid Peshkin, David A. Weitz, and Marc W. Kirschner. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 161(5) :1187–1201, 2015.
- [111] Freeman Lan, John R. Haliburton, Aaron Yuan, and Adam R. Abate. Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing. *Nature Communications*, 7 :1–10, 2016.

CONFIDENTIEL

- [112] Li Li Wang, Kun Zhang, Chun Yang Xiong, and Zi Gang Ge. Cytotoxicity of core-shell polystyrene magnetic beads and related mechanisms. *Molecular and Cellular Toxicology*, 8(3) :217–227, 2012.
- [113] Ivo Šafařík and Mirka Šafaříková. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2) :33–53, 1999.
- [114] Donald L. Elbert, Curtis B. Herbert, and Jeffrey A. Hubbell. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir*, 15(16) :5355–5362, 1999.
- [115] Norah O’Farrell, Andrew Houlton, and Benjamin R. Horrocks. Silicon nanoparticles : Applications in cell biology and medicine. *International Journal of Nanomedicine*, 1(4) :451–472, 2006.
- [116] Yongfen Chen and Zeev Rosenzweig. Luminescent CdS quantum dots as selective ion probes. *Analytical Chemistry*, 74(19) :5132–5138, 2002.
- [117] Elisabeth Zillner, Steffen Fengler, Phenwisa Niyamakom, Frank Rauscher, Karen Köhler, and Thomas Dittrich. Role of ligand exchange at CdSe quantum dot layers for charge separation. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(31) :16747–16754, 2012.
- [118] J.D.R.N.H. Teller, C.D. Gruttner, S.D.R.N. Rudershausen, and F.D.P. Westphal. Process for the preparation of coloured and fluorescent polysilicic acid particles.
- [119] Diana Hernandez and Lilian Hook. Stem cell differentiation : How to find a path through the labyrinth. *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 30(5) :81–84, 2012.

---

## Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique

**Résumé :** Ce travail de thèse concerne l'encapsulation de microalgues pour produire des molécules d'intérêt cosmétique. L'utilisation de capsules à cœur liquide et à membrane d'hydrogel semi-perméable permet d'une part de protéger ces cellules des contraintes extérieures et des contaminations; de l'autre de nourrir les cellules encapsulées en profitant de la semi-perméabilité de la membrane, et de trois de faciliter leur manipulation. Ces avantages permettent de cultiver des microalgues à des concentrations bien supérieures à celles classiquement atteintes ( $10^{10}$  vs  $10^7$  / mL) et de faciliter la production de molécules d'intérêt par élicitation. Aucun impact négatif de l'encapsulation n'est à déplorer. Nous tirons enfin avantages des capsules pour proposer une preuve de concept de criblage combinatoire reposant sur l'adsorption de colloïdes sur nos capsules. Un tel outil permet de cribler des séquences de conditions de culture, ce qui est très difficilement réalisable du fait des nombres en jeu.

**Mots-clés :** capsule – cosmétique – microalgues – lipides – criblage combinatoire– bio-procédés

---

---

## Encapsulation and elicitation of microalgae for cosmetics

**Abstract :** This work focuses on encapsulation of microalgae to produce molecules of interest for cosmetics. Using liquid-core and semi-permeable hydrogel shell capsules, we are able to protect the cells from external constraints while feeding them through their semi-permeable membrane. Additionally, the capsules enable us to manipulate the cells in an easier way. These advantages combined, we grow microalgae at much higher concentrations than what we are able to do in bulk ( $10^{10}$  vs  $10^7$  /mL); change the medium smoothly and elicitate these cells to induce the production of molecules of interest. Encapsulation is shown to carry no negative impact on the cells. Finally, we leverage on the capsules to demonstrate a proof of concept for combinatorial screening based on adsorption of colloids on our capsules. That enable us to screen for sequences of culture conditions, which is otherwise quite difficult to perform because of the large numbers involved.

**Keywords :** capsule – cosmetics – microalgae – lipids – split-pool - bioprocess

---