



HAL
open science

Mesure du métabolisme de la levure par flux osmotiques entre gouttes d'émulsion

Laurent Boitard

► **To cite this version:**

Laurent Boitard. Mesure du métabolisme de la levure par flux osmotiques entre gouttes d'émulsion. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2010. Français. NNT : . pastel-00622593

HAL Id: pastel-00622593

<https://pastel.hal.science/pastel-00622593>

Submitted on 12 Sep 2011

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université Paris VII - Denis Diderot

Ecole Doctorale 518 : MATIERE CONDENSEE ET INTERFACE

Spécialité : Interfaces Chimie Physique Informatique et Biologie

MESURE DU MÉTABOLISME DE LA LEVURE PAR FLUX OSMOTIQUES ENTRE GOUTTES D'ÉMULSION.

présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2010 par

Laurent Boitard

devant le jury composé de

David BENSIMON

Jérôme BIBETTE (Directeur de Thèse)

Erez BRAUN

Bernard CABANE

Annie COLIN (Rapporteur)

Jean-Marc DI MEGLIO

Andrew GRIFFITHS (Rapporteur)

Gaël YVERT

Table des matières

Introduction	7
1 Biologie de la levure	11
1.1 Généralités	11
1.2 Le cycle biologique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.2.1 Prolifération : le cycle cellulaire	14
1.2.2 Transitions : la fécondation et la sporulation	15
1.3 Métabolisme chez la levure	18
1.3.1 Généralités sur la thermodynamique cellulaire	18
1.3.2 Métabolisme du glucose chez <i>S. cerevisiae</i>	19
1.3.3 Métabolismes non-carbonés	22
1.4 Cinétique et croissance cellulaire	23
1.4.1 La croissance selon Monod	23
1.4.2 Systèmes ouverts et cultures en "batch"	25
1.4.3 Cultures continues et théorie du chémostat	26
1.4.3.1 Présentation du chémostat	26
1.4.3.2 Modèle simplifié	27
1.4.3.3 Les méthodes de culture continue	28
1.4.3.4 Y_{ATP} : rendement bioénergétique	29
1.4.3.5 Energie de maintenance et métabolisme endogène	30

1.4.3.6	Origines de l'énergie de maintien	32
1.5	Conclusion	33
2	Etude à l'échelle d'une microcolonie	35
2.1	Les microbioréacteurs	36
2.1.1	La microfluidique pour les microbioréacteurs	36
2.1.1.1	Transfert de masse et de chaleur dans les microbioréacteurs	37
2.1.1.2	Fabrication des microbioréacteurs	39
2.1.2	Etat de l'art des microbioréacteur et leur applications	42
2.2	Réseau de microbioréacteurs	48
2.2.1	Fabrication des micro-gouttes	48
2.2.1.1	Application d'un cisaillement contrôlé	48
2.2.1.2	Emulsification en micro-canaux	50
2.2.2	Encapsulation des cellules	56
2.2.2.1	Encapsulation stochastique	58
2.2.2.2	Encapsulation contrôlée par l'hydrodynamique	59
2.2.3	Fabrication du réseau bi-dimensionnel de microbioréacteurs	61
2.2.3.1	Emulsion cristallisable	61
2.2.3.2	Pièges à gouttes en PDMS	62
2.2.4	Stabilité des micro-gouttes	65
2.3	Echanges entre les microbioréacteurs	67
2.3.1	Mûrissement d'Ostwald	67
2.3.2	Mûrissement de composition	67
2.3.3	Flux d'eau par gradient de pression osmotique	67
2.3.4	Mesure du transport entre les gouttes	69
2.4	Conclusion	70
3	Dispositif expérimental	71
3.1	Stockage de gouttes dans une chambre en verre	73
3.1.1	Dispositifs microfluidiques	73
3.1.2	Arrêt des gouttes	75
3.1.3	Compaction de l'émulsion	77
3.2	Mesures	81
3.2.1	Mesure de la biomasse	81

3.2.2	Mesure du volume des gouttes	84
3.3	Mûrissement des gouttes du réseau	86
3.3.1	Emulsions adhésives	86
3.3.2	Mesure du transport	88
3.3.2.1	Modèle de perméation	89
3.3.2.2	Caractérisation	91
3.3.3	Mesure de l'activité biologique	93
3.4	Conclusion	94
4	Mesure du métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	95
4.1	Observations phénoménologiques	96
4.1.1	Conservation de la masse	96
4.1.2	Reproductibilité du phénomène	97
4.1.3	Aérobie/anaérobie	98
4.1.4	Potentiel de notre approche	100
4.2	Modélisation	103
4.2.1	Facteur de conversion osmotique	103
4.2.2	Régime avec le glucose comme réactif limitant	105
4.2.3	Régime où le glucose n'est pas le réactif limitant	109
4.3	Mesure de paramètres du métabolisme	113
4.3.1	Sensibilité du système aux paramètres du modèle	113
4.3.2	Mesure de l'énergie de maintien	117
4.3.2.1	Principe de la mesure	117
4.3.2.2	Détermination expérimentale	119
4.3.3	Interprétation et applicabilité	122
4.3.3.1	Différentiation de souches	122
4.3.3.2	Vers un criblage à haut-débit	123
	Conclusion générale	127
	ANNEXES	129
	ANNEXE A : Microfabrication	130
	ANNEXE B : Calcul du volume d'une goutte aplatie	132
	ANNEXE C : Composition du milieu de culture synthétique	133

Introduction

La fermentation alcoolique est un procédé connu et utilisé depuis l'antiquité comme en témoignent les résidus trouvés à l'intérieur d'une jarre de vin égyptien datant de 3150 avant J-C [Cavaliere et al., 8 01]. Ce procédé bio-chimique a permis à l'homme de produire des boissons avec une haute teneur en alcool dont les propriétés enivrantes, analgésiques, désinfectantes en ont fait la drogue et le remède les plus répandus de l'antiquité.

La première observation de l'organisme responsable de cette transformation est due au biologiste flamand Van Leeuwenhoek en 1680. En 1835, Charles Cagniard de la Tour (1777-1850) montre que le processus de fermentation alcoolique est le fait de la présence de cellules vivantes qui se multiplient par bourgeonnement, suggérant un rôle direct de champignons dans la fermentation. Le botaniste Meyen donnera le nom de *Saccharomyces cerevisiae* à ce micro-organisme. Mais c'est Louis Pasteur, le père de la microbiologie, qui entre 1855 et 1875, établit sans équivoque le rôle de la levure dans la fermentation alcoolique, la différence entre l'utilisation du sucre en présence de dioxygène (aérobie) ou non (anaérobie) et enfin qu'il s'agit d'un phénomène physiologique :

"L'acte chimique de la fermentation est essentiellement un phénomène corrélatif d'un acte vital, commençant et s'arrêtant avec ce dernier. Je pense qu'il n'y a jamais fermentation alcoolique sans qu'il y ait simultanément organisation, développement, multiplication de globules [NDR : levures], ou vie poursuivie, continuée, de globules déjà formés"[Pasteur, 1860].

En outre de son utilisation historique pour l'élaboration de spiritueux, l'éthanol issu de la fermentation est devenu une alternative pour la production de carburant. En effet, ces dix dernières années, la consommation des ressources fossiles dépasse la vitesse à laquelle elles sont découvertes

[Greene et al., 2006] si bien que de nouvelles voies industrielles sont développées pour remplacer ou compléter le pétrole. Les enjeux de cette conversion sont à la fois économiques, politiques (indépendance énergétique) et écologiques (fixation/émission de CO₂).

Le bioéthanol de première génération est issu de la fermentation par *S. cerevisiae* des hexoses (sucres à 6 carbones) contenus dans les graines (maïs), les tubercules (betterave) ou encore toutes les cultures destinées à la consommation (canne à sucre) qui contiennent du sucre ou de l'amidon. Sa production est déjà industrialisée, le Brésil et les Etats-Unis en sont les plus gros producteurs. Toutefois, la compétition qui résulte de l'exploitation des mêmes ressources à la fois pour l'alimentation et pour la production de bioénergie, ou encore l'empreinte écologique (érosion des sols, bilan carbone) font que le bioéthanol de première génération n'est pas une option durable pour remplacer le pétrole sur le long terme [De Oliveira et al., 2005].

La seconde génération de bioéthanol repose sur l'utilisation par les micro-organismes de substrats lignocellulosiques issus des déchets forestiers, de l'agriculture et de l'agro-alimentaire ou de cultures dédiées. La fermentation de ces matières premières est plus complexe que les méthodes conventionnelles de production d'éthanol. Elle nécessite en outre une étape de "saccharification" qui consiste à hydrolyser les polymères qui constituent la paroi des végétaux (lignine, cellulose, hémicellulose) en sucres simples. Par exemple, l'hydrolyse de l'hémicellulose génère une quantité non négligeable de pentoses (sucres à 5 carbones) qui ne peuvent pas être fermentés par *S. cerevisiae*. Seulement 1% des espèces de levures sont capables de métaboliser le xylose en éthanol [Barnett et al., 2000]. De plus, les hydrolysats de plante contiennent de nombreux composés qui inhibent la croissance microbienne. Aussi, pour rendre cette méthode de production du bioéthanol compétitive économiquement, il faut que tous les sucres issus de la première étape soient transformés en éthanol, que les micro-organismes soient tolérants aux sous-produits de la fermentation et de la "saccharification" et que tout le procédé puisse se faire dans des conditions industrielles. Le plus grand défi que rencontre l'industrie des biocarburants consiste donc à trouver les micro-organismes qui répondent à ces critères.

S. cerevisiae demeure l'espèce qui offre le plus de promesses car elle est adaptée à la production de bioéthanol à grande échelle. Les progrès de l'ingénierie génétique ont permis de modifier son métabolisme afin d'élargir le champ des sucres qu'elle peut métaboliser. Par exemple, Kuyper et al. ont créé une souche capable de fermenter le xylose dans des conditions anaérobiques en lui faisant exprimer une isomérase du xylose issue d'un champignon filamenteux [Kuyper et al., 2005]. Il existe un grand nombre de méthodes qui permettent de développer des bibliothèques de nouvelles souches (mutagenèse, croisements,...). Toutefois le facteur limitant l'amélioration des souches reste

le criblage. Ainsi faut-il développer des méthodes et des critères qui permettent de sélectionner les candidats les plus performants.

Le criblage basé sur le métabolisme des micro-organismes est un défi car les méthodes de mesure ne sont pas nécessairement adaptées à un format haut-débit. Pour la plupart des criblages métaboliques, le critère de sélection est soit le métabolite sécrété soit la consommation d'un composant du milieu qu'il va falloir quantifier. Pour accéder à une mesure spécifique à chaque individu de la bibliothèque (clone), il faut développer une stratégie de compartimentalisation. Chaque clone poussant séparément, il est alors possible d'accéder au métabolisme individuelle. La notion de haut débit est importante car il faut tester une combinatoire de souches et de conditions conséquentes pour trouver la souche qui permettra la production industrielle de bioéthanol à partir de biomasse végétale.

Nous avons développé un système miniaturisé qui permet le suivi haut débit de la cinétique de consommation de métabolites pour des colonies individuelles de *S. cerevisiae*. Les cellules de levure sont isolées dans des gouttes d'émulsion dans lesquelles elles se divisent jusqu'à l'épuisement d'un substrat. La concentration au cours du temps en soluté est mesurée par l'évolution du volume de la goutte contenant les cellules. La variation de volume est la réponse, par le biais de flux osmotiques entre les gouttes, de notre système à l'activité métabolique. Cette méthode de mesure du métabolisme qui est nouvelle, nous donne accès à des paramètres difficilement accessibles par les méthodes de culture traditionnelle. Elle permet à la fois la sélection d'individus ainsi que la mesure de leur performances.

Ce manuscrit est constitué de quatre chapitres. Dans un premier temps nous présentons l'objet de notre étude à savoir *Saccharomyces cerevisiae*. Nous aborderons les paramètres qui caractérisent sa croissance et son métabolisme ainsi que les méthodes de culture traditionnelles (bioréacteur). Dans un second chapitre introductif, nous illustrons les progrès de la miniaturisation des bioréacteurs grâce à l'apport de la microfluidique, qui ont permis d'augmenter les débits d'analyse. Nous présentons dans le chapitre 3, le mode de fabrication de notre microsystème et les méthodes de mesures développées. Pour terminer, nous présentons les résultats obtenus pour l'analyse du métabolisme de *S. cerevisiae* dans des cas modèles afin de valider notre approche. Nous concluons ainsi sur les possibilités de criblage offertes par notre système.

CHAPITRE 1

Biologie de la levure

La bière est la preuve que Dieu nous aime et veut que nous soyons heureux.

(BENJAMIN FRANKLIN)

La levure est l'objet de nombreux manuels de biologie car elle est un modèle de cellule eucaryote [Thuriaux, 2004]. Nous présenterons dans ce chapitre introductif certains des aspects de la levure qui rendent la ou les levures si intéressantes aux yeux des biologistes et des industriels.

1.1 Généralités

On distingue principalement deux classes de cellules : les procaryotes, qui englobent le règne bactérien, et les eucaryotes, qui regroupent les plantes (embryophytes), les champignons et les animaux. Les levures représentent l'ensemble des champignons monocellulaires appartenant au phylum des ascomycètes. Au-delà de la présence d'un noyau qui les caractérise, les eucaryotes ont une structure cellulaire hautement organisée (Fig. 1.1). Ils contiennent des organites possédant leur propre génome (mitochondries et chloroplastes) ou dépourvues de génomes (péroxyosomes), un système vésiculaire comportant le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les endosomes et le lysosome (vacuole). Les cellules de levure ont tous les attributs des eucaryotes mais se distinguent des cellules végétales et animales par leur petite taille (Tab. 1.1).

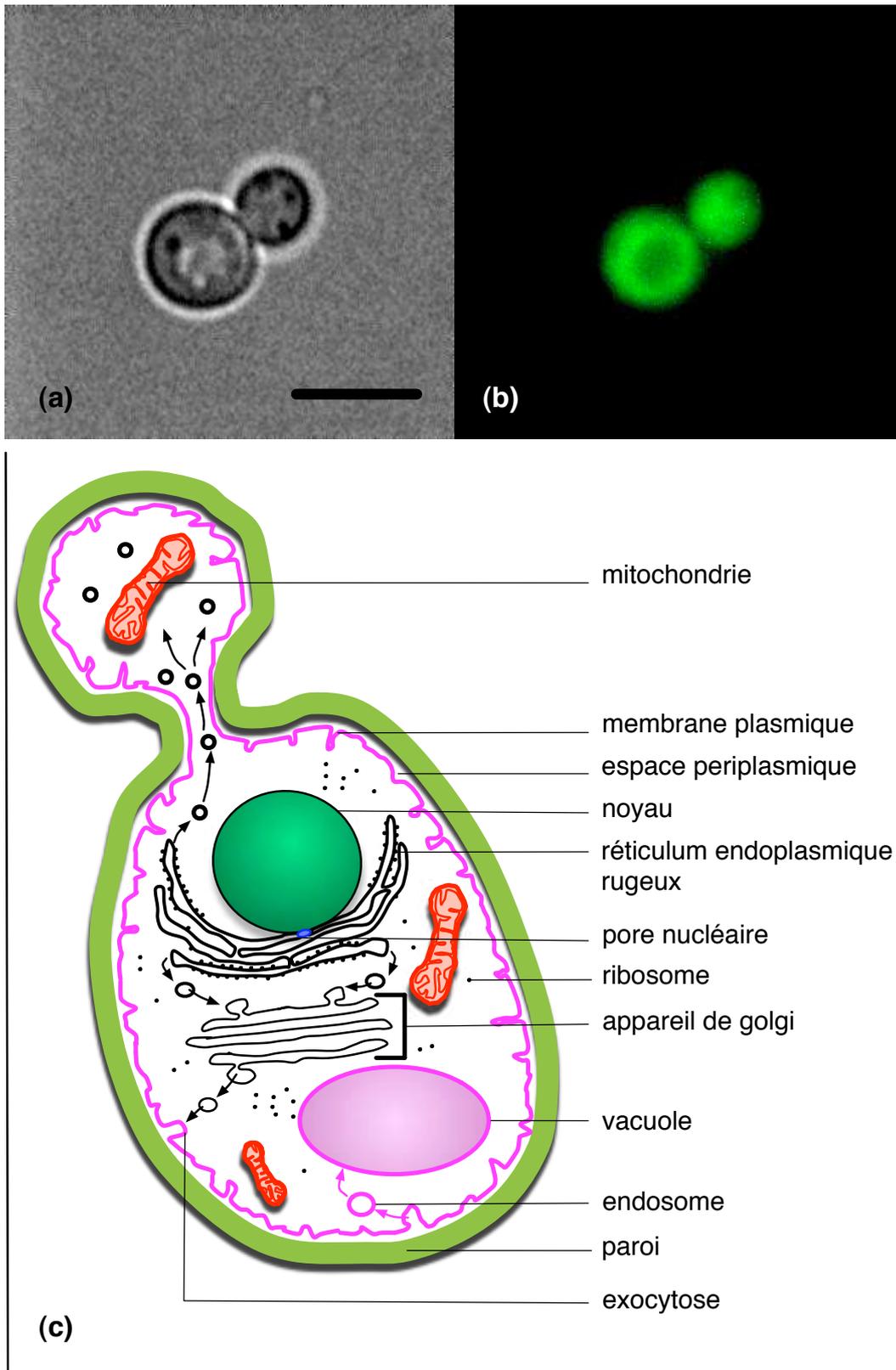


FIGURE 1.1 – Processus de bourgeonnement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. (a) Image en transmission, l'échelle correspond à $5\mu\text{m}$; (b) Image en épifluorescence : le cytosquelette d'actine a été marqué par un rapporteur fluorescent citrine ; (c) Représentation idéalisée d'une cellule de levure, inspiré de [Thuriaux, 2004].

Parmi ces champignons monocellulaires, *Schizosaccharomyces Pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* sont les deux levures les plus étudiées. Elles ont des morphologies très distinctes : la première a une forme de bâtonnet allongé, la seconde est une cellule oblongue à bourgeonnement asymétrique (Fig. 1.1). Cela se traduit par des stratégies de divisions différentes. La distance génétique entre ces deux espèces est comparable à celle qui sépare la mouche du vinaigre (*Drosophila*) de l'homme. Les deux génomes ont été entièrement séquencés ce qui permet d'avoir deux modèles de cellules eucaryotes très différents.

TABLE 1.1 – Taille et composition des levures [Sherman, 2002].

Caractéristique	Cellule haploïde	Cellule diploïde
Volume (μm^3)	70	120
Composition (10^{-12}g)		
Masse humide	60	80
Masse sèche	15	20
ADN	0.017	0.034
ARN	1.2	1.9
Protéines	6	8

Dans la suite de ce manuscrit nous nous concentrerons sur *S. cerevisiae* qui est la levure la plus utilisée dans l'industrie.

Comment cet organisme unicellulaire est-il capable de survivre dans son environnement, de se diviser et de se reproduire ?

1.2 Le cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae*

Le cycle biologique complet comprend deux aspects importants de la vie de *S. cerevisiae*. Le premier correspond à la prolifération cellulaire : la division d'une cellule avec formation de deux cellules essentiellement identiques. Le deuxième aspect correspond à des changements de ploïdie (nombre de chromosomes). Ces transitions dans le cycle ont lieu par la fécondation (fusion de cellules) et la méiose, *i.e.*, la réduction du nombre de chromosomes. Ces processus biologiques importants ont aussi lieu dans les organismes supérieurs. Ainsi, l'étude de défauts dans la division de la levure peuvent aider à une meilleure compréhension de la prolifération par exemple des cellules tumorales.

1.2.1 Prolifération : le cycle cellulaire

S. cerevisiae présente la particularité d'être haplodiplobionte, *i.e.*, capable de se propager végétativement tant à l'état haploïde qu'à l'état diploïde. Il existe même des souches polyploïdes utilisées notamment pour la brasserie qui possèdent plusieurs copies des 16 chromosomes. Toutes ces souches, $1n$, $2n$, Xn se divisent par mitose pour produire des populations clonales, identiques génétiquement. Contrairement à d'autres micro-organismes tels la levure *Schizosaccharomyces pombe* ou la bactérie *Escherichia coli* qui se divisent par fission, la levure de bière se divise de manière asymétrique, par bourgeonnement (Fig. 1.1).

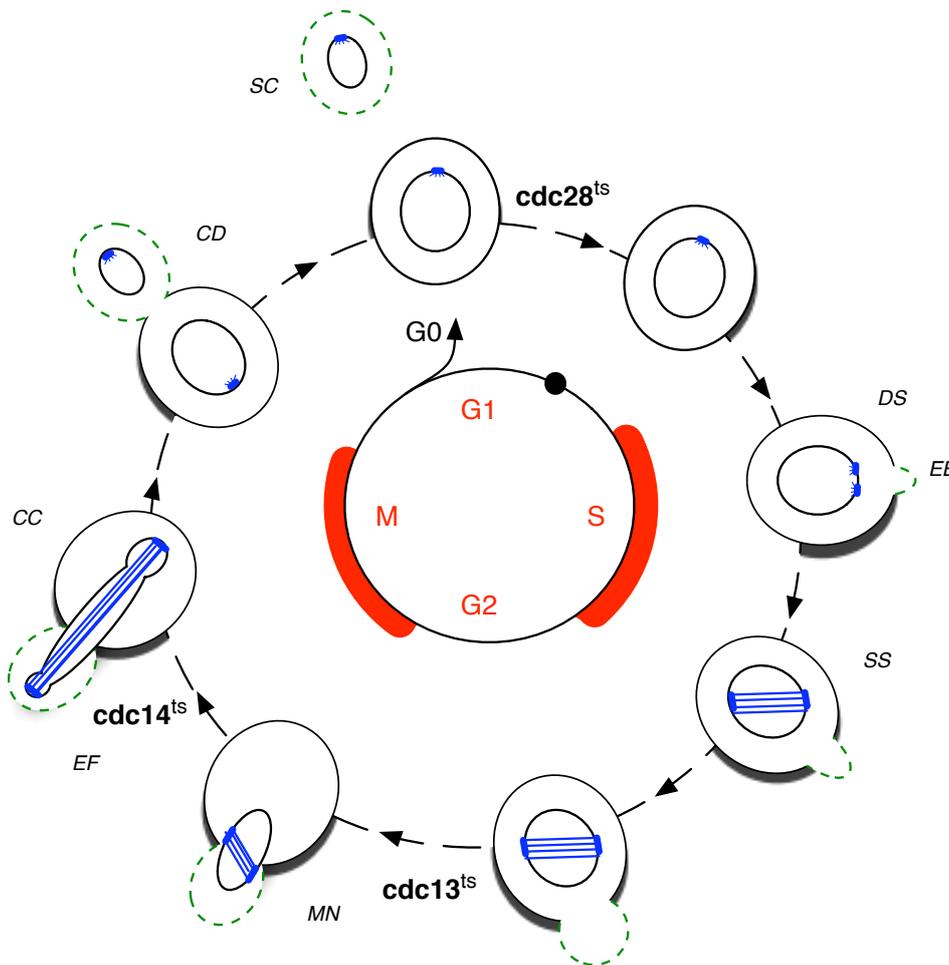


FIGURE 1.2 – Cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*. La cellule mère est dessinée en trait solide. Les bourgeons et cellules filles sont dessinés en pointillés. En bleu sont représentés les *spindle pole body*, (SPB) et les microtubules. Le rond en G1 correspond à un point appelé START. En gras sont indiqués différents mutants thermosensibles aux endroits du cycle où ils sont bloqués. S, synthèse d'ADN ; M, mitose (division nucléaire) ; G0, phase stationnaire ; DS, duplication du SPB ; EB, émergence du bourgeon ; SS, séparation des SPBs ; MN, migration du noyau ; EF, élongation du fuseau mitotique ; CC, caryocinèse (séparation des noyaux) ; CD, cytotédièrese (séparation des membranes plasmiques) ; SC, séparation des cellules. Inspiré de [Hartwell, 1974; Herskowitz, 1988; Werner-Washburne et al., 1993]).

Ainsi, la cellule mère donne naissance à une cellule fille, plus petite, formée de constituants de surface (paroi et membrane plasmique) nouveaux. La fille nouvellement formée doit alors atteindre une taille critique pour pouvoir dépasser le point START et commencer son propre cycle de division. Lorsque les nutriments font défaut, les cellules peuvent rentrer en phase stationnaire (G0) dans laquelle elles ne se divisent plus, accumulent des réserves et modifient la composition de leur paroi [Werner-Washburne et al., 1993]. La prolifération peut reprendre lorsque les levures sont à nouveau en présence de nutriments.

Remarque : Mutants thermosensibles L'étude de mutants thermosensibles, c'est-à-dire, dont l'allèle muté ne s'exprime qu'au-delà d'une certaine température dite "permissive" (37°C par exemple pour *cdc28*, voir Chapitre 4), a permis d'élucider la coordination des différents événements du cycle cellulaire [Hartwell et al., 1973; Hartwell, 1974]. Ces mutants sont bloqués à un stade précis du cycle cellulaire. Ils présentent une morphologie cellulaire homogène et sont appelés *cdc* ("cell division cycle"). Par exemple, le gène CDC28 lorsqu'il est muté, provoque un arrêt en G1 car la protéine Cdc28 qui lui est associée est nécessaire pour passer le point d'arrêt "START". Cdc28 (encore appelée Cdk1) est une sérine-thréonine kinase, *i.e.*, elle est capable de transférer un groupement phosphate aux résidus sérine et thréonine des protéines (nous parlerons de la phosphorylation dans la partie sur le métabolisme). Son activité est conditionnée à son association à d'autres protéines (cyclines, co-facteurs activateurs CKA, co-facteurs inhibiteurs CKI) pour former des complexes qui vont réguler la réplication de l'ADN, la duplication des SPBs et l'émergence du bourgeon.

Enfin, ces Cdks ("cycline-dependent kinases") qui contrôlent la divisions cellulaire sont extraordinairement conservées chez les eucaryotes. L'un des premiers indices a été la complémentation des mutants *cdc2* de *S. pombe* (homologue de *cdc28* chez *S. cerevisiae*) par un ADNc humain codant pour une protéine kinase [Nasmyth, 2001].

1.2.2 Transitions : la fécondation et la sporulation

Bien que les micro-organismes passent la majorité de leur existence à se multiplier de manière végétative, il arrive qu'ils se reproduisent par conjugaison, *i.e.*, de manière sexuée. La conjugaison chez *S. cerevisiae* n'est possible qu'entre cellules de type sexuel différent. Ainsi des cellules haploïdes de type a et α fusionnent pour donner une nouvelle cellule diploïde a/ α qui est capable de se diviser par mitose et qui ne rentre en méiose que lors de carences sévères.

Chez *S. cerevisiae*, la fécondation (FIG. 1.3) dure environ six heures. Les cellules haploïdes de chaque type sécrètent des peptides qui préparent les cellules à la fécondation. Ces molécules sont

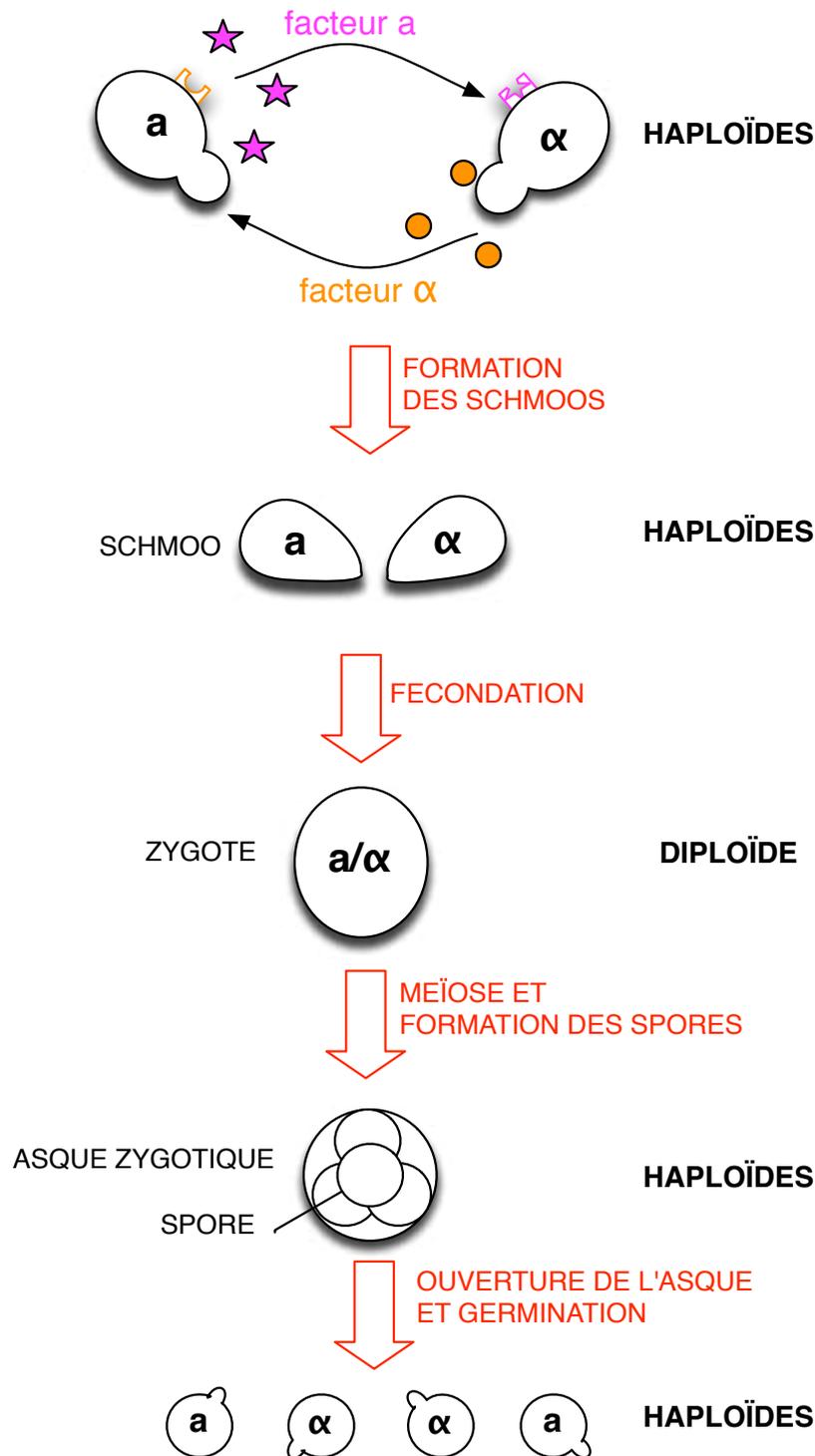


FIGURE 1.3 – Transitions dans le cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae*. Les trois types de cellules (**a**, **α** et **a/α**) sont capables de se diviser par division mitotique (Fig. 1.2). Ce diagramme montre les changements de ploïdie : la fécondation entre deux cellules haploïdes donne un zygote diploïde et la méïose rétablit l'haploïdie dans les spores. Les cellules **a/α** produisent un asque qui contient les quatre spores, produits de la méïose. La fécondation fait intervenir des messagers, des phéromones sexuelles qui préparent les cellules à la fécondation. Inspiré de [Herskowitz, 1988; Thuriaux, 2004].

appelées phéromones. Elles remplissent un rôle de communication et ont un mode d'action sur la cellule similaires à certaines hormones chez les organismes multicellulaires [Thuriaux, 2004].

Les cellules α produisent le facteur α , un peptide de 13 acides aminés et les cellules **a** produisent le facteur **a**, un peptide de 12 acides aminés [Duntze et al., 1973]. Ces phéromones sexuelles induisent un arrêt des cellules en phase G1 du cycle de division cellulaire, juste avant l'initiation de la synthèse d'ADN (elles agissent sur CDC28). Avant de pouvoir fusionner, la cellule doit donc finir de se diviser. Le bourgeonnement inhibé, la liaison de la phéromone à son récepteur induit aussi une réorientation de la polarité de croissance, de sorte que chaque partenaire se projette vers la cellule de type sexuel opposé, formant une cellule très caractéristique, le "schmo".

Les cellules, lorsqu'elles fusionnent, possèdent le même nombre de copies de chaque chromosome et produisent un zygote diploïde. Les facteurs sexuels sont des inhibiteurs de la croissance et peuvent ainsi être utilisés à cette fin pour synchroniser dans la même phase du cycle cellulaire (G1) une population de cellules haploïdes de type sexuel opposé à la phéromone [Breedon, 1997]. On parle alors de synchronisation chimique.

Nous avons vu que la levure pouvait vivre et se multiplier sous plusieurs états, haploïde et diploïde, qui diffèrent par leur taille cellulaire et le nombre de chromosomes qu'elles renferment. Il existe des homologues de séquences entre un grand nombre de gènes de la levure et de l'homme qui ont été mises à jour lors des séquençages des génomes de *S. cerevisiae* [Goffeau et al., 1996] et de *Homo sapiens* [Venter et al., 2001]. Aussi le séquençage de nouvelles espèces de levures promet par l'étude comparative d'aborder en terme moléculaire l'organisation et l'évolution des génomes eucaryotes.

Enfin, la compréhension des mécanismes de régulation, de communication et les acteurs mis en jeu lors du cycle biologique d'un organisme modèle telle que la levure peut nous éclairer sur des mécanismes plus complexes chez l'homme :

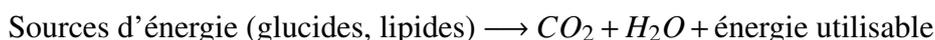
"Chaque fois que j'ai identifié un aspect intrigant concernant le cancer, j'ai trouvé qu'il pouvait être abordé plus efficacement avec une cellule eucaryote simple, Saccharomyces cerevisiae, qu'avec une cellule humaine." (LELAND HARTWELL, discours réalisé lors de l'obtention de son Prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2001 pour la co-découverte avec Paul Nurse et Tim Hunt des protéines Cdk, [Hartwell, 2004])

1.3 Métabolisme chez la levure

En dehors des paillasse des biologistes, on trouve principalement *Saccharomyces cerevisiae* sur les fruits en décomposition dont elle extrait le sucre nécessaire à ses besoins énergétiques. Comment extrait-elle l'énergie et le pouvoir réducteur des sucres ? Comment synthétise-t-elle les précurseurs des macromolécules et les macromolécules qui la constitue ?

1.3.1 Généralités sur la thermodynamique cellulaire

Les organismes vivants constituent des systèmes ouverts et l'environnement qui les entoure constitue le milieu extérieur. Toute cellule est le siège de milliers de réactions biochimiques qui mettent en jeu des transferts de matière et d'énergie, c'est le *métabolisme*. On peut répartir les voies métaboliques en deux grandes classes. Les réactions qui transforment par oxydation les molécules source d'énergie en énergie cellulaire sont appelés *catabolisme*.



A l'inverse, les réactions de réduction qui nécessitent de l'énergie pour former des macromolécules sont appelés *anabolisme*.



Le métabolisme comprend donc de nombreuses réactions couplées et interconnectées. Une réaction se produit spontanément lorsque la variation d'énergie libre (ΔG) est négative (réaction exergonique).

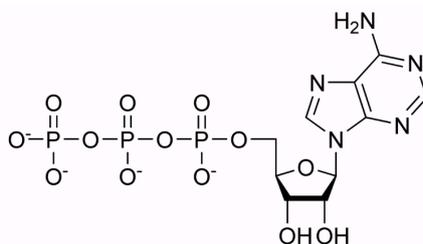


FIGURE 1.4 – Structure chimique de l'Adénosine Tri-Phosphate.

L'adénosine triphosphate (FIG. 1.4) est l'unité universelle d'énergie libre des systèmes biologiques. Elle est issue du catabolisme de molécules sources d'énergie ou synthétisée par l'intermédiaire

d'un gradient ionique grâce à l'ATP synthétase. La double liaison phospho-anhydride que contient l'ATP en fait une molécule riche en énergie, c'est-à-dire que son hydrolyse :



est énergétiquement favorable : $\Delta G^{\circ'} = -30,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Ainsi, une réaction thermodynamiquement défavorable peut avoir lieu si elle est couplée à cette hydrolyse, l'équilibre étant alors déplacé d'un facteur environ 10^8 [Berg et al., 2008] .

Enfin, les voies métaboliques présentent de nombreux motifs récurrents. Un petit nombre de transporteurs activés, *i.e.*, dont le transfert d'un groupement chimique ou d'électrons est exergonique, sont constamment utilisés dans les voies métaboliques. Ils permettent de restituer de l'énergie potentielle pour la création de nouvelles molécules d'ATP .

1.3.2 Métabolisme du glucose chez *S. cerevisiae*

L'équilibre signifie la mort en biologie. Pour conserver le déséquilibre thermodynamique, la levure doit constamment utiliser de l'ATP. La principale source de production d'énergie chez *S. cerevisiae* est issue de l'oxydation du glucose. La première étape consiste à convertir le glucose en pyruvate par la glycolyse aussi appelée la voie d'Embden-Meyerhof. Le bilan de cette réaction d'oxydo-réduction est la production de 2 molécules d'ATP et de 2 molécules de transporteur activé NADH par molécule de glucose.

Ensuite, il existe deux modes principaux pour l'utilisation du pyruvate : la respiration et la fermentation (Fig. 1.5). Les rendements énergétiques (en tout cas, théoriques) sont très différents puisque la respiration peut produire jusqu'à 17 fois plus d'ATP par molécule de glucose. Ainsi, Louis Pasteur découvrit un effet qui porte son nom : en présence d'oxygène les micro-organismes préfèrent la voie de la respiration. Néanmoins, *S. cerevisiae* échappe à cet effet et l'on parle d'effet Crabtree pour qualifier sa forte adaptation à la fermentation, même en présence d'oxygène. Cette faible respiration en présence de dioxygène est due, à l'échelle moléculaire, à ce qu'on appelle la répression du glucose [Rodrigues et al., 2006]. La présence de glucose induit une inhibition de la synthèse des enzymes nécessaires à la respiration [Barnett and Entian, 2005].

Pourquoi la levure a-t-elle fait le choix de la fermentation par rapport à la respiration ? Une piste provient du fait que le rendement en ATP de la respiration n'est pas aussi important que le rendement théorique [Lagunas, 1986]. En conditions d'aérobiose, la levure consomme 70 à 75% du sucre total pour produire de l'ATP (TAB 1.2). Le reste est consommé pour la biosynthèse 20% et le maintient du

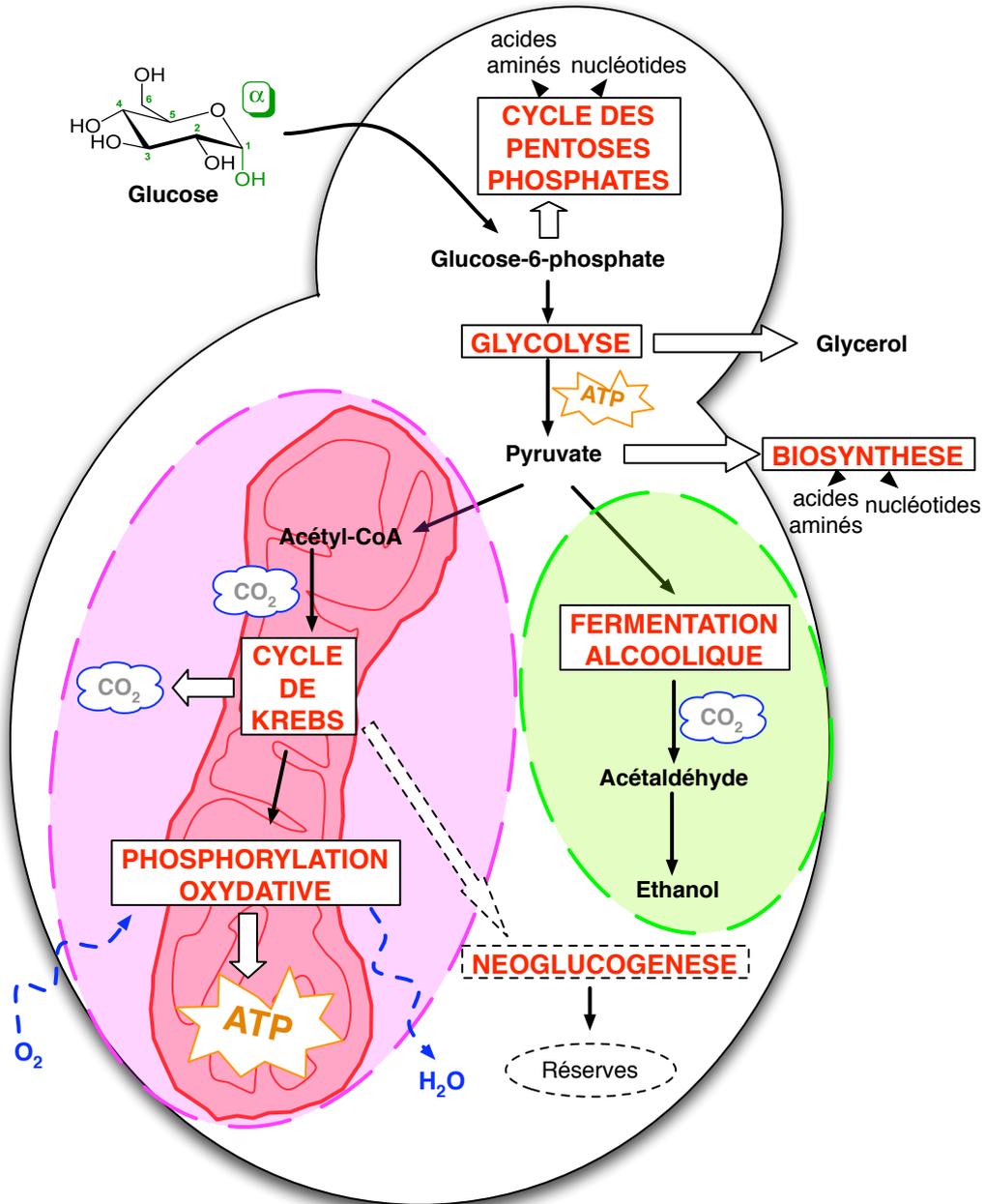


FIGURE 1.5 – Métabolisme du glucose chez la levure. Le glucose est oxydé soit par la voie des pentoses phosphates, qui permet de la biosynthèse des produits dérivés des sucres à 5 carbones, soit par la glycolyse. La glycolyse permet la synthèse d’ATP et de pouvoir réducteur (transporteurs activés). Le pyruvate peut être ensuite oxydé par la fermentation (anaérobie en vert) ou par la respiration (aérobie en magenta). La fermentation alcoolique produit de l’éthanol moyennant la consommation de transporteurs activés qui permet de rétablir l’équilibre rédox des cellules. La respiration a lieu dans les mitochondries. Le pyruvate y est totalement oxydé en dioxyde de carbone via l’acétyl-coenzyme A. Le rendement théorique de la respiration est de 34 molécules d’ATP dont la plupart sont produites dans la membrane interne des mitochondries par la phosphorylation oxydative, qui restaure l’état oxydé des cofacteurs et transporteurs par une cascade de transporteurs d’électrons. Le gradient de protons ainsi créé au travers de la membrane mitochondriale est converti en ATP par l’ATP synthétase (Adapté de [Rodrigues et al., 2006]).

potentiel rédox, de 5 à 10% [Lagunas, 1986].

TABLE 1.2 – Utilisation des sucres (en %) dans différentes fonctions cellulaires chez *S. cerevisiae* [Lagunas, 1979].

Fonctions	Glucose	Maltose	Galactose
Synthèse de structures cellulaires	13	17	26
Production d'ATP			
Respiration	3	4	14
Fermentation	73	69	53
Potentiel Rédox et autres fonctions	11		5

Il est important de noter que la fermentation chez *S. cerevisiae* est très rapide durant la croissance en aérobiose et plus lente en anaérobiose. Cela peut s'expliquer par le fait que certains composants nécessaires à la croissance des levures nécessitent la présence de dioxygène pour leur synthèse. C'est le cas de certains acides gras et de l'ergosterol, nécessaires au renouvellement de la membrane plasmique [Andreasen and Stier, 1953, 1954; Verduyn et al., 1990b]. De plus, la croissance des levures (*i.e.*, la biosynthèse de matériel cellulaire), s'accompagne d'un surplus de transporteurs activés qui sont réduits lors la synthèse de glycérol. Ceci explique en partie pourquoi le rendement en ATP par molécule de glucose en condition d'anaérobiose est limité [Verduyn et al., 1991; Rodrigues et al., 2006].

La diauxie et les autres métabolites carbonés

On présence de dioxygène, lorsque le glucose est épuisé, *S. cerevisiae* réoriente son métabolisme vers la respiration de l'éthanol et du glycérol. Ce processus de respiration des substrats libérés par la fermentation s'appelle la *diauxie* et permet une croissance en deux temps. Elle met en jeu une voie appelée néoglucogenèse qui est l'inverse de la glycolyse et qui convertit le pyruvate en glucose. La néoglucogenèse assure la synthèse du glucose, mais aussi des sucres de réserve (tréhalose et glycogène), qui atteignent quelque 30% du poids sec en croissance sur éthanol [Thuriaux, 2004]. On retrouve ces réserves chez les cellules en phase stationnaire. Ces stocks sont utilisés quand la levure entre en diète carbonée et conduit, dans les cellules diploïdes, à la méiose.

1.3.3 Métabolismes non-carbonés

Le métabolisme carboné est source d'énergie et de pouvoir réducteur. Il demeure la principale source de biomasse (le carbone, l'oxygène et l'hydrogène des substrats carbonés contribuent pour près de trois quarts du poids sec de la cellule). Le reste de l'apport nutritif nécessaire à la croissance et à la division cellulaire est dû au métabolisme azoté et au métabolisme soufré, auxquels il faut ajouter le phosphate et les différents ions physiologiques [Thuriaux, 2004]. Les levures sont capables de synthétiser leurs métabolites azotés à partir de composés simples comme l'ammonium et l'urée. Toutefois, les levures sont des organismes saprophytes, *i.e.*, elles recyclent les acides aminés, bases azotées et de nombreux autres métabolites azotés à partir de matière organique.

Par ailleurs, la levure est caractérisée par une répression catabolique azotée qui favorise les meilleures sources d'azote. Ainsi, en anaérobiose, le rendement en ATP est meilleur et la quantité de glycérol synthétisée est inférieure dans le cas de cultures supplémentées en acides aminés qu'avec des ions ammoniums [Albers et al., 1996].

Enfin, la vacuole joue un rôle central dans le stockage des réserves métaboliques non-carbonées. L'azote cellulaire y est recyclé par protéolyse. Quant au phosphate, il y est stocké sous la forme de polyphosphates dont l'abondance reflète sans doute la rareté des substrats phosphatés dans l'environnement naturel des levures.

1.4 Cinétique et croissance cellulaire

Il est important de distinguer les notions de croissance et de division cellulaire. La croissance est l'augmentation globale de la biomasse de la population, indépendamment du fait que les cellules se divisent ou non. On mesure la croissance soit par la densité optique à 600nm ou par pesée de la masse sèche des cellules après évaporation complète de l'eau cellulaire qui représente environ 80% de la masse humide. Nous verrons dans cette partie : la cinétique de croissance ainsi que certaines des méthodes de cultures utilisées depuis les 60 dernières années pour étudier la bioénergétique des micro-organismes en général.

1.4.1 La croissance selon Monod

Dans *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes* (1942), Jacques Monod établit les bases de la microbiologie en la dotant de techniques expérimentales qui permettent le suivi cinétique de la croissance cellulaire. Bien que ces résultats aient été obtenus sur deux bactéries, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, les lois qui en découlent s'appliquent aux autres micro-organismes hétérotrophes. Par des mesures du rendement en biomasse, Y , par unité de substrat consommé, il retrouve la loi de Liebig : la quantité maximale de cellules qui peut être obtenue dépend de la quantité de nutriment disponible dans le milieu de culture. D'où la relation linéaire entre β_m , la biomasse maximale, et s_0 , la concentration en substrat dit *limitant* :

$$\beta_m = \beta_0 + Y s_0 \quad (1.1)$$

La figure 1.6 présente les différentes phases de croissance rencontrées lors d'une culture de levure *S. cerevisiae* en milieu liquide en "batch" (voir la section suivante). On peut décrire la croissance exponentielle en introduisant le *taux de croissance*, μ , tel que la biomasse au cours du temps β suit l'équation différentielle :

$$\frac{d\beta}{dt} = \mu \beta \quad (1.2)$$

On en déduit une solution de la forme exponentielle :

$$\beta = \beta_0 \exp(\mu t) \quad (1.3)$$

tel que $\mu = \frac{\ln 2}{\tau}$ et τ est le temps de division (doublement de la population). Ce temps est compris entre 90 et 120 minutes chez *S. cerevisiae*. Il s'agit d'une valeur moyenne pour la population. En effet, le

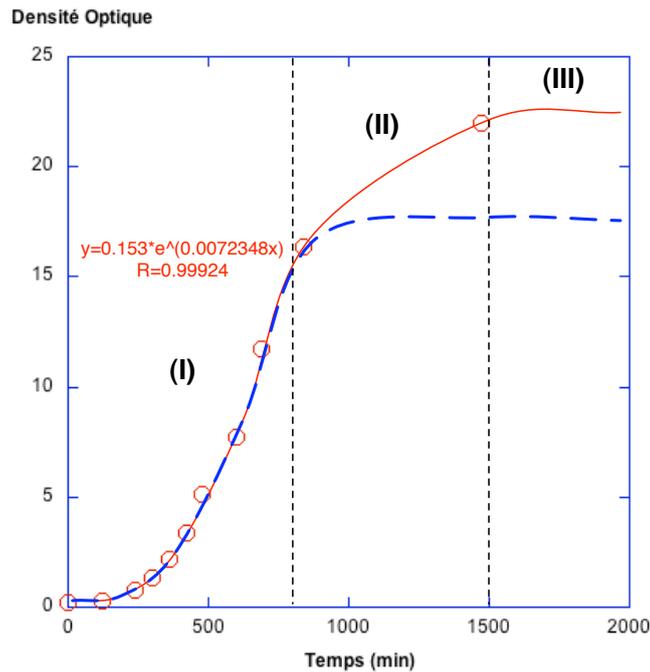


FIGURE 1.6 – Courbe de croissance d’une culture liquide de *S. cerevisiae* dans milieu de culture synthétique SDall (voir Annexe) contenant 15% de glucose. La mesure de densité optique est effectuée par un spectromètre à 600nm. En bleue, la courbe en pointillés représente la courbe en S typique de la croissance de micro-organismes décrite par Monod (1949). On distingue 3 phases. (I) la phase exponentielle est ajustée par l’équation 1.3 et donne un temps de division de 96 minutes ; (II) la phase de diauxie correspond à l’épuisement total du glucose et à l’assimilation des produits de la fermentation ; (III) la phase stationnaire est accompagnée d’une vacuolisation prononcée et d’un arrêt de la division en phase G1 du cycle mitotique. Cette phase est réversible et les cellules repartent plus ou moins rapidement en présence de milieu frais.

temps de division n’est pas le même selon l’âge de la cellule. Comme indiqué dans la section sur le cycle cellulaire, les cellules filles doivent atteindre une taille critique pour pouvoir se diviser. Ainsi, les mères se divisent-elles en environ 70 minutes et les cellules filles en une centaine de minutes.

Le nombre de divisions n’est pas illimité et une cellule ne peut pas se diviser plus de 24 fois en moyenne, les dernières divisions pouvant prendre jusqu’à 6 heures [Mortimer and Johnston, 1959]. Mais dans les conditions de culture utilisées, le nombre de générations n’est pas aussi élevé et on observera alors la cinétique des individus les plus rapides.

Toutefois cela ne veut pas dire que le *taux de croissance* est une constante. Cette notion est au coeur de la théorie de Monod qui relie le taux de croissance, μ , à la concentration en *substrat limitant*, s . Il démontre que c’est la déplétion en nutriments et non l’accumulation de métabolites

toxiques qui est responsable de la décélération puis de l'arrêt de la croissance dans les cultures de micro-organismes (Fig. 1.6).

$$\mu = \mu_{max} \frac{s}{K_s + s} \quad (1.4)$$

En combinant l'équation 1.3 et 1.4, on peut retrouver la courbe en S qui possède une saturation [Panikov, 1995]. μ_{max} est le *taux de croissance maximum* atteint quand il y a un excès de nutriments dans le milieu. Bien que l'équation de Michaelis-Menten, décrivant la cinétique enzymatique, et l'équation 1.3 soient mathématiquement analogues, la signification de K_m et K_s est différente. La cinétique de croissance décrite par l'équation de Monod est d'une nature plus complexe et met en jeu plus d'une seule réaction enzymatique. K_s représente la constante de saturation, *i.e.*, la concentration en substrat pour $\mu = 0.5\mu_{max}$.

Le modèle de Monod n'est pas indiscutable et une variété d'autres modèles a depuis été développé pour rendre compte au mieux des données expérimentales obtenues lors de la croissance de micro-organismes [Kovarova-Kovar and Egli, 1998]. Néanmoins, le modèle de Monod reste le plus utilisé de par sa simplicité (uniquement deux paramètres à ajuster).

1.4.2 Systèmes ouverts et cultures en "batch"

On distingue habituellement en thermodynamique des systèmes isolés, fermés ou ouverts. Les premiers n'échangent ni énergie ni matière avec le monde extérieur ; les seconds échangent seulement de l'énergie et les troisièmes échangent énergie et matière avec leur environnement. Selon cette définition, toutes les cultures de cellules correspondent des systèmes ouverts. Le système de "culture liquide" le plus simple, dit culture en "batch", consiste à disposer dans un récipient des nutriments, à rajouter un inoculum et à laisser évoluer la culture (le principe est le même en "culture solide" sur boîte de Pétri).

Ce dispositif biotechnologique est vieux de plusieurs milliers d'années (il est retrouvé pour la fabrication de la bière par les Egyptiens de l'antiquité) et utilisé par des populations actuelles dites primitives (fermentations alcooliques diverses, etc.). Ce dispositif est toujours d'actualité et est l'un des dispositifs les plus utilisés dans nos laboratoires modernes. Il apparaîtra facilement comme un système non isolé, car le batch est le plus souvent, soit non isolé thermiquement, soit thermostaté. Dans les deux cas, il échange de la chaleur avec son environnement. En fait, l'ensemble des réactions du métabolisme cellulaire est globalement exothermique et il y a production de chaleur au sein de l'enceinte de culture.

Par contre, le batch ne semble pas intuitivement être un système ouvert. Effectivement, microor-

ganismes et milieu de culture sont confinés dans le récipient et les phases "solides" et liquides sont effectivement séparées du monde extérieur. Cependant, que la culture soit aérobie ou anaérobie, il existe un flux gazeux entre la culture et le monde extérieur. Dans le cas d'une culture aérobie, de l'air (ou de l'oxygène) est fourni au système et un mélange différent (enrichi en dioxyde de carbone, par exemple) le quitte. Dans le cas de cultures anaérobies, il y a au moins toujours du CO₂ qui quitte la culture cellulaire. D'autres gaz et/ou des substances volatiles s'échappent également du système.

Nous devons donc admettre que, strictement parlant, toutes les cultures (en tout cas, toutes les cultures usuelles) sont en réalité des systèmes ouverts. Il existe cependant une distinction entre les modes de culture qui sont ouverts uniquement par rapport à la phase gazeuse et ceux qui échangent de la matière sous d'autres états physiques (liquides et/ou solides en suspension). Ces derniers appartiennent à la catégorie des cultures continues ou semi- continues (que nous appellerons toutes deux « cultures continues » pour alléger le texte).

1.4.3 Cultures continues et théorie du chémostat

Dans cette section nous étudierons les équations qui régissent les variables dynamiques que sont la quantité de cellule ou biomasse, β , et la concentration en substrat limitant, s , dans les cultures à débit continu ou chémostats.

1.4.3.1 Présentation du chémostat

La figure 1.7 représente schématiquement le dispositif du bioréacteur appelé "chémostat" ou encore CSTR (en anglais : "Continuously Stirred Tank Reactor"). Pour l'essentiel, il s'agit d'une cuve [1] (en verre ou en acier inoxydable, selon les dimensions), le plus souvent thermostatisée [11]. D'un côté, le milieu nutritif [9] à une concentration s_0 , caractérisé par un substrat (nutriment) limitant, est amené dans la cuve par une pompe [8a] avec un débit volumique F_1 (en volume par unité de temps). Par ailleurs, l'excès du liquide du bioréacteur est éliminé, souvent par une autre pompe [8b], de manière à maintenir le volume utile V constant, ce qui implique un débit de sortie F_2 égal au débit d'entrée : $F_1 = F_2 = F$. Compte tenu de la consommation cellulaire, la concentration du substrat limitant dans la branche de sortie vaut $s(t)$. Un système d'agitation [3] assure autant que possible le mélange parfait au sein du bioréacteur. Ce système d'agitation peut être très différent selon le type de culture (procaryotes, levures, cellules de mammifères, etc...). Un surpresseur [5] permet d'envoyer un gaz dans la culture (oxygène ou air, pour les cultures aérobies ; azote ou gaz neutre pour les cultures anaérobies). Un système de mesure débitométrique [13] et/ou un système d'humidification (barboteur)

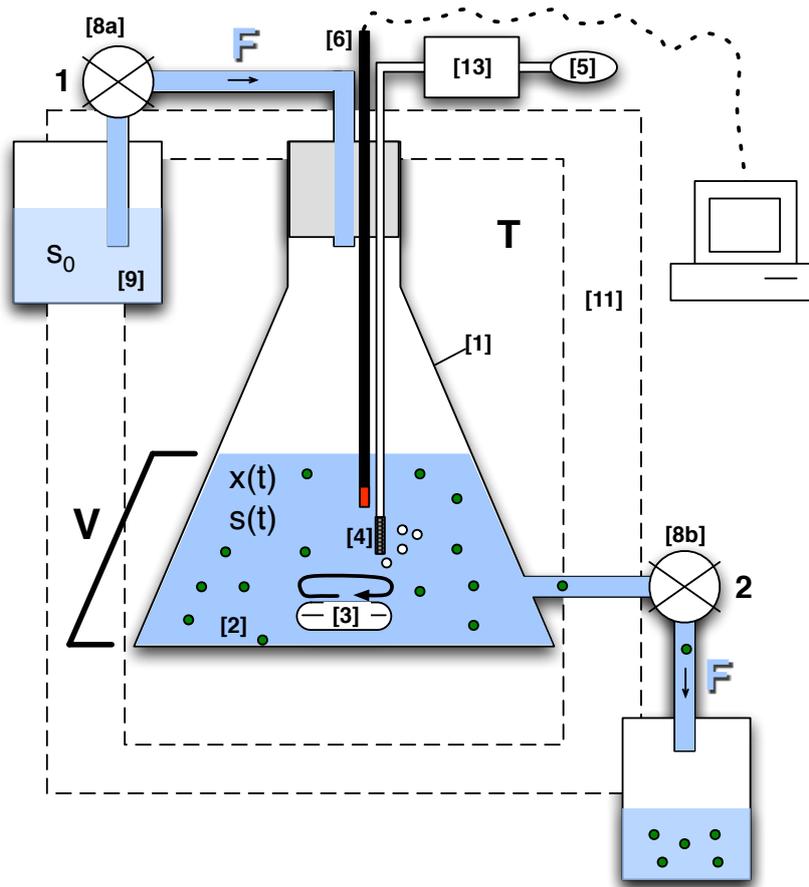


FIGURE 1.7 – Représentation schématique d'un chémostat. Les débits d'entrée (1) et de sortie (2) sont réglés de manière à ce que le volume V de culture reste constant. Une bonne agitation est nécessaire pour que la culture soit homogène.

est placé entre le supresseur et le diffuseur de gaz [4] immergé dans le milieu de culture. Enfin, une série de capteurs [6] permettent une mesure on-line (ou non) de divers paramètres comme la température, le pH, le potentiel redox et même parfois la biomasse.

1.4.3.2 Modèle simplifié

Considérons le système de culture simplifié représenté sur la figure 1.7.

Appelons V le volume de la culture, F le débit volumétrique. On peut alors déduire $D = \frac{F}{V}$, le taux de dilution (vidange) de la culture. Les débits d'entrée et de sortie sont identiques afin de garder V constant. Ecrivons les équations différentielles qui régissent ce modèle.

- Pour les micro-organismes :

variation de biomasse dans le réservoir = biomasse totale - biomasse diluée (vidangée) du réservoir

$$\frac{d\beta_r}{dt} = \frac{d\beta_T}{dt} - \frac{d\beta_v}{dt} = (\mu - D)x_r \quad (1.5)$$

La variation de biomasse totale, $\beta_T = \beta_r + \beta_v$, est obtenue en divisant l'équation 1.2 par le volume du réservoir.

- Pour le substrat limitant :

variation du substrat dans le réservoir = substrat entrant - substrat diluée - substrat consommé

$$\frac{ds}{dt} = Ds_0 - Ds - \frac{\beta_r}{Y}\mu = D(s_0 - s) - \frac{\beta_r}{Y}\mu \quad (1.6)$$

Le principe fondamental du modèle de chémostat repose sur le fait que le système ouvert ainsi décrit peut atteindre un état stationnaire, i.e, quand les variables s et β ne varient plus au cours du temps. A l'état stationnaire, les deux équations 1.5 et 1.6 s'annulent. On en déduit que $\mu = D$, le taux de croissance des micro-organismes égale le taux de dilution, qui est sous le contrôle de l'expérimentateur. On déduit aussi que la biomasse à l'état-stationnaire dans le réservoir, contrairement à la relation 1.1, ne dépend pas de β_0 mais dépend seulement du rendement Y et de la différence $s_0 - \bar{s}$, \bar{s} étant la concentration en substrat dans le chémostat à l'état stationnaire. L'implication biologique importante de la théorie du chémostat est que les micro-organismes peuvent pousser indéfiniment avec un taux de croissance compris entre 0 et μ_m . Cette théorie a un vaste champ d'applications allant de la biosynthèse enzymatique à l'étude de la dynamique des populations [Smith and Waltman, 1995].

1.4.3.3 Les méthodes de culture continue

Au cours des 60 dernières années, un grand nombre de techniques de culture continues ont été développées (turbidostat, pH-stat, chemostat en série, cytostat). Elles présentent toutes des avantages et des inconvénients qui dépendent principalement de l'objet de l'étude. Dans le cas du chémostat, où la croissance stationnaire est contrôlé par la concentration en substrat limitant, les très faibles et les très fortes valeurs de μ ne peuvent être atteintes car dans un cas il faut attendre trop longtemps pour atteindre l'état stationnaire et dans l'autre cas la culture risque d'être diluée hors du réacteur. Pour palier à ces difficultés, les techniques de "fed-batch" ont été développées. Il s'agit de cultures en batch à laquelle on rajoute de manière continue du substrat [Pirt, 1979]. Cela donne lieu à des cultures à volume variable ou a volume constant. Pour ces dernières, l'utilisation de membranes de dialyse permettent la diffusion du nutriment d'un compartiment renfermant le substrat en excès vers le réacteur. Pour chacune de ces méthodes on peut écrire un modèle en faisant le bilan des masses. On s'aperçoit alors qu'il est possible d'atteindre des régimes quasi-stationnaires pour des μ très faibles au bout de quelques semaines, au lieu de plusieurs mois dans le cas du chémostat. Grâce à ces nouvelles méthodes expérimentales et aux modèles développés, les biologistes ont pu aborder la bioénergétique

et élucider certains comportements des micro-organismes.

1.4.3.4 Y_{ATP} : rendement bioénergétique

Nous avons vu au travers de l'équation 1.1 qu'il existait une relation linéaire entre la biomasse que l'on pouvait former et la concentration de substrat limitant présente dans le milieu de culture (FIG. 1.8).

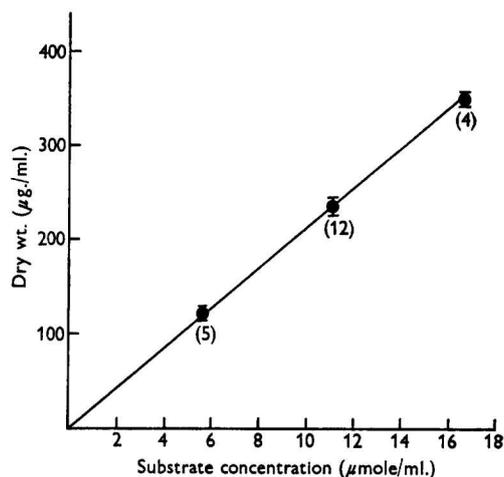


FIGURE 1.8 – Croissance de *S. cerevisiae* dans des cultures anaérobies en batch. Le chiffre entre parenthèses donne le nombre d'estimations réalisées. Extrait de [Bauchop and Elsdén, 1960].

Organisme	Substrat limitant	$Y_{substrat}$	Y_{ATP}
<i>S. faecalis</i>	Arginine	10.5	10.5
<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	21	10.5

TABLE 1.3 – Rendements de croissance pour deux micro-organismes hétérotrophes. $Y_{substrat}$ en g masse sèche/mole de substrat et Y_{ATP} en g masse sèche/mole ATP [Bauchop and Elsdén, 1960].

Bauchop et al. ont proposé de redéfinir le rendement afin de lui donner une signification biologique. Connaissant le rendement énergétique d'un métabolite, donné en mole d'ATP/mole de substrat (il est de 2 moles d'ATP par mole de glucose dans le cas de la voie d'Embden-Meyerhof), et le rendement en biomasse, donné en masse sèche de cellules/mole de substrat limitant, on peut définir un rendement Y_{ATP} en masse sèche de cellules/mole d'ATP. Cela permet, pour reprendre les termes des auteurs, de rendre compte de "l'énergie biologique utile" rendue disponible par catabolisme que la cellule est capable d'utiliser pour créer de la biomasse [Bauchop and Elsdén, 1960].

La comparaison de *S. faecalis* et de *S. cerevisiae* illustre le concept que Y_{ATP} est approximativement une constante pour la croissance microbienne et vaut entre 8.3 et 12.6 g de cellules formées par mole d'ATP généré avec le substrat catabolisé (TAB. 1.3). Cela sous-entend que dans les cultures étudiées, une part insignifiante du substrat limitant soit assimilée comme matière cellulaire, que la quantité du substrat à l'origine de l'énergie et le gain énergétique soient connus avec certitude et enfin que la croissance soit limitée par la source d'énergie. Y_{ATP}^{max} peut être calculé théoriquement en prenant en

compte l'énergie nécessaire pour former tous les constituants de la cellules [Stouthamer, 1973].

TABLE 1.4 – Calcul de la valeur théorique de Y_{ATP}^{max} pour *S. cerevisiae* dans une culture anaerobique [Verduyn et al., 1990a].

	ATP nécessaire [mmol ATP (100g biomasse) ⁻¹]
Synthèse acides aminés	181
Polymérisation acides aminés	1776
Synthèse hydrocarbones	463
Synthèse acides gras	0
Synthèse et polymérisation ARN	135
Recyclage ARN_m	71
Synthèse NADPH	44
Transport des ions	860
Total	3539
<hr/>	
Y_{ATP}^{max} théorique	28.3 g biomasse (mol ATP ⁻¹)

La tableau 1.4 révèle que la synthèse protéique est la plus consommatrice d'ATP (ca 50% des ressources). La valeur nulle pour la synthèse d'acides gras s'explique par le fait que la levure nécessite de l'oxygène pour leur synthèse. Enfin, on observe une grande différence entre les valeurs théorique et expérimentale du rendement. Comment expliquer cette différence ?

1.4.3.5 Energie de maintenance et métabolisme endogène

Le rendement Y définit dans l'équation 1.1 comme la variation de biomasse sur la variation de concentration en substrat limitant. Cependant il peut aussi s'exprimer en fonction du taux de croissance, μ , et du taux de consommation du substrat,

$$q = -\frac{1}{\beta} \frac{ds}{dt}$$

tel que

$$Y = \frac{\mu}{q} = \frac{D}{q}$$

Il s'ensuit que si le rendement était une véritable constante comme suggéré par Bauchop, q devrait varier linéairement avec le taux de dilution D et par extrapolation valoir zéro à taux de dilution nul. La figure 1.9 illustre le fait que la dernière proposition soit fausse : il n'y a pas de couplage strict entre l'anabolisme (synthèse de biomasse) et le catabolisme (consommation du glucose). Ceci est confirmé par l'observation que des cellules en phase stationnaires, *i.e.*, dont la croissance est nulle, consomme

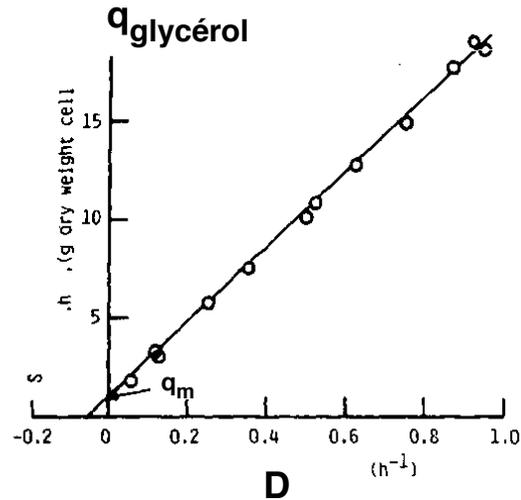


FIGURE 1.9 – Influence du taux de dilution D sur le taux de consommation de glycérol q_{glycerol} . Les observations ont été réalisées dans un chimostat avec le glycérol comme substrat limitant sur une culture de *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 poussant dans du milieu minéral à 37°C. Extrait de [Tempest and Neijssel, 1984].

de l'énergie [Russell and Cook, 1995].

Plusieurs hypothèses s'imposent alors pour expliquer cette déviation : les cellules consomment en plus du substrat, leur propre matière organique (réserves), une partie du métabolisme est détournée de la croissance et sert à entretenir des fonctions à l'intérieur de la cellule [Pirt, 1965] ou encore une partie de l'énergie est dissipée [Russell and Cook, 1995]. Pirt a montré que mathématiquement les deux premières hypothèses revenaient à la même équation. Considérons la deuxième hypothèse, à savoir, qu'une partie du métabolisme est détournée vers des fonctions d'entretien de la cellule. On peut alors redéfinir le taux de consommation du substrat observé :

$$q = q_g + q_m \quad (1.7)$$

où q_g est la consommation de substrat associée à la croissance et q_m la consommation nécessaire à remplir les fonctions d'entretien de la cellule. Il s'en suit que le rendement "réel" s'écrit : $Y = \frac{\mu}{q_g + q_m}$ ainsi $\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{\text{max}}} + \frac{q_m}{\mu}$ d'où la relation :

$$q = \frac{\mu}{Y_{\text{max}}} + q_m \quad (1.8)$$

Y_{max} est le rendement énergétique associé à la croissance cellulaire appelé encore rendement maximum. On peut le mesurer par la pente ($\Delta q / \Delta \mu$). La valeur de q_m est extrapolée pour $D = 0$ (FIG. 1.9).

En corrigeant Y_{ATP} par le terme de maintenance on ne parvient pas encore à la valeur théorique [Verduyn et al., 1991]. De plus, le rendement dépend du taux de dilution [Russell and Baldwin, 1979].

Dans les cultures en excès de glucose, le rendement est fonction du substrat limitant utilisé tel que l'énergie consommée est bien supérieur à l'énergie nécessaire pour la biosynthèse et le maintien [Tempest and Neijssel, 1984]. Ainsi la dernière hypothèse est à considérer. Une partie de l'énergie n'est ni utilisée pour la biosynthèse, ni pour l'entretien. Il existe un certain nombre de modèles qui ont été développés pour expliquer ce découplage entre le métabolisme et la biosynthèse [Pirt, 1982; Neijssel and Tempest, 1976]. Nous nous contenterons de rajouter un terme dans l'équation 1.7 tel que :

$$q = \frac{\mu}{Y_{max}} + q_m + d \cdot \mu \quad (1.9)$$

$d \cdot \mu = q_d$ est la partie dissipée du taux de consommation de glucose et dépend du taux de dilution. d éventuellement est une fonction de la concentration en sucre qui suit une loi du type Michaelis-Menten. Ainsi, aux fortes concentrations en glucose ce terme de "perte" est élevé. En ajoutant des termes dans le modèle, il devient difficile de trouver des significations biologiques aux divers paramètres. Toutefois nous pouvons essayer de décrire les fonctions de maintien ainsi que les réactions qui sont à l'origine de la dissipation d'énergie.

1.4.3.6 Origines de l'énergie de maintien

Pour des raisons thermodynamiques, le maintien de l'équilibre ionique à l'intérieur de la cellule est le plus consommateur d'énergie. Par exemple, l'augmentation de la salinité du milieu de culture chez *S. cerevisiae* se traduit par une plus grande énergie de maintien. L'énergie de maintien est multipliée par 4 lorsque 1M de NaCl est ajoutée au milieu de culture [Watson, 1970].

Les changements de métabolisme peuvent être responsables d'erreur sur l'évaluation du rendement énergétique tout comme les cycles futiles. Ceux-ci concernent principalement des voies métaboliques qui fonctionnent de manière antagoniste (glycolyse et néoglucogenèse par exemple). Le résultat est la dissipation d'énergie. D'autres effets sont décrits dans la littérature [Tempest and Neijssel, 1984].

Enfin, il convient de distinguer les phénomènes de dissipation d'énergie lors de la croissance par rapport à ceux observés lorsque que les cellules ne se divisent plus (phase stationnaire). En effet, dans le dernier cas toutes les cellules ne sont pas strictement dans le même état physiologique. Ainsi, certaines sont en train de mourir et il n'y a donc pas de raison pour que la dissipation aie la même origine. On parlera alors de métabolisme endogène dans le cas des phases sans division [Russell and Cook, 1995].

1.5 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre certaines des principales caractéristiques d'un micro-organisme modèle comme la levure. Avec un cycle de division de ~ 120 minutes, la levure se multiplie rapidement en métabolisant du sucre et des composés azotés. La production d'énergie par la respiration et par la fermentation, principal mode de catabolisme, ne sert par totalement à la production de biomasse mais assure aussi le maintien de processus cellulaires indispensables à la survie de la cellule.

D'un point de vue biotechnologique, l'énergie de maintenance peut être, comme la langue d'Esopé, la meilleure et la pire des choses. Pour une production qui consiste à produire exclusivement de la biomasse ou des protéines monocellulaires (single-cell proteins), l'optimisation du processus visera à réduire le gaspillage d'énergie. Dans un processus comme l'épuration des eaux, le procédé idéal serait celui qui gaspillerait l'énergie au maximum, la biomasse produite étant un déchet solide non souhaité. S'il s'agit de produire des sous-produits utiles (alcools, solvants, antibiotiques), l'énergie de maintenance est alors souhaitable [Russell and Cook, 1995].

La croissance cellulaire peut également intervenir favorablement, et "l'interdépendance du produit de formation et de la croissance microbienne est un facteur déterminant pour l'optimisation du rendement de la productivité" [Hollander, 1993]. L'optimisation passe alors par un compromis entre gaspillage d'énergie et production de biomasse. Cette optimisation nécessite de tester beaucoup de facteurs différents qui influent sur la productivité. Dans cette perspective il nous faut développer des outils qui nous permettent d'accéder aux paramètres du métabolisme et de la croissance pour un grand nombre de conditions. Ainsi, nous présenterons dans les prochains chapitres des méthodes d'analyse à haut-débit de cultures de micro-organismes.

Etude à l'échelle d'une microcolonie

Les grandes choses dérivent souvent des petites.

(Proverbe arabe)

Nous avons vu dans le premier chapitre que l'étude de la croissance, de la bioénergétique voire les procédés industriels de fermentation ou de synthèse de protéines par les micro-organismes se faisaient dans des bioréacteurs. Ces outils de culture usuels pour les microbiologistes et les industriels ont peu évolué depuis plusieurs dizaines d'années. Ils permettent un contrôle totale des conditions de culture mais souffrent de leur complexité et de la difficulté à les paralléliser. Le développement des bioprocédés industriels et la recherche sur les micro-organismes nécessitent de cribler les meilleurs souches microbiennes, d'optimiser les conditions de cultures, de comprendre les réseaux de régulation ou encore l'intégration des signaux environnementaux par les cellules. Pour cela, il faut développer des outils qui permettent des expériences à haut débit dans des conditions contrôlées.

Nous verrons dans ce chapitre les récentes avancées dans la miniaturisation et le multiplexage des bioréacteurs grâce à l'essor de la microfluidique. Le terme "bioréacteur" référera à tout compartiment dans lequel a lieu un événement biologique, élargissant ainsi le champ des applications au dehors de la microbiologie. Nous présenterons ensuite un nouveau type de bioréacteur mis au point pendant cette thèse, qui permet l'étude de processus biologiques en conservant un potentiel chimique constant.

2.1 Les microbioréacteurs

Selon le procédé biologique étudié ou exploité, il est nécessaire de créer de la biomasse (épuration) ou au contraire de la réduire (fermentation). La conception de microbioréacteurs doit donc permettre une certaine souplesse afin de s'adapter aux conditions de culture et aux micro-organismes étudiés. Les bioréacteurs traditionnels (CSTR) sont à cet égard très versatiles et permettent la culture en batch, en fed-batch ou encore continue, sous une plage large de conditions environnementales. En effet, la température, le pH ou encore la quantité de gaz dissout sont contrôlés et un certains nombre de variables (consommation du substrat, quantité de biomasse) sont mesuré tout au long du procédé [Schäpper et al., 2009]. Comparé à ces réacteurs qui opèrent avec des volumes de 0.5 à 5L, les microbioréacteurs utilisent des volumes entre 10nL et 800µL. Grâce à leur petite taille, ces réacteurs offrent un certains nombres d'avantages économiques : des coûts réduits d'utilisation des substrats, une réduction des dimensions, permettant la parallélisation et une réduction des coûts de production. Un premier exemple de ce type de microbioréacteurs est l'utilisation de microplaques pour la culture cellulaire [Duetz and Witholt, 2004] et qui permet de réaliser du criblage à haut débit en utilisant la robotisation et les outils déjà utilisés dans les criblages pharmacologiques.

TABLE 2.1 – Volumes des puits et nombre moyen de cellules par puits pour des microplaques [Tian and Finehout, 2009].

Format microplaque (nombre de puits)	96	384	1536	3456
Volume moyen/puits (µL)	200	50	8	2
Nombre moyen de cellules/puits	40000	5000	4000	700

Le tableau 2.1 présente les capacités de multiplexage des microplaques. Duetz et al. ont montré qu'ils pouvaient obtenir la même croissance (taux de division et biomasse) que dans des cultures en Erlenmeyer (culture en batch) avec des microplaques de 384 puits sous agitation et oxygénées [Duetz and Witholt, 2004]. Dans la suite de cette partie nous nous intéresseront seulement aux microréacteurs issus de la microfluidique.

2.1.1 La microfluidique pour les microbioréacteurs

La microfluidique est par définition la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petites quantités (10^{-6} à 10^{-18} litres) de liquides par l'utilisation de canaux dont les dimensions sont de la dizaine à la centaine de microns [Whitesides, 2006]. La figure 2.1 illustre de manière extrême la réduction de volume réalisée. De par leur faible encombrement, une des plus grandes promesses des

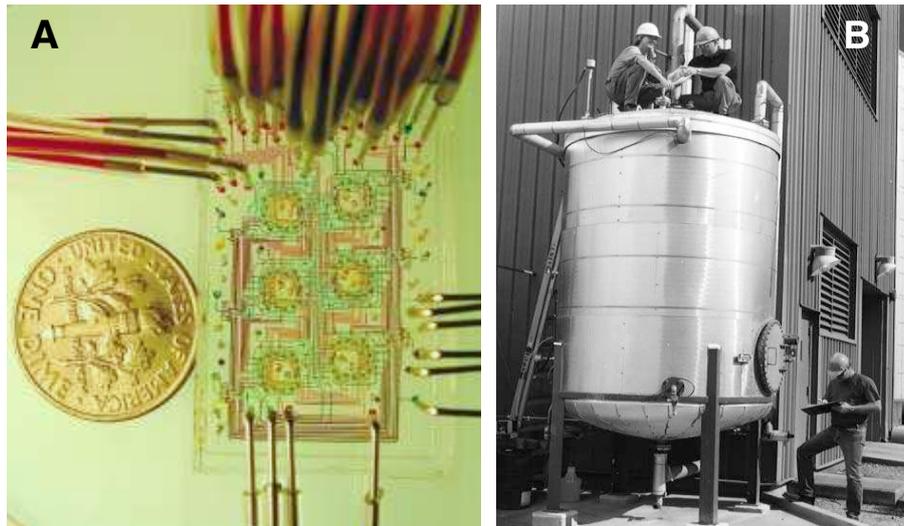


FIGURE 2.1 – Bioreacteur et microbioreacteur. A : Six microchemostats en parallèle sur la même puce microfluidique pour l'étude de la croissance bactérienne [Balagadde et al., 2005] ; B : Bioreacteur de 8000L pour la fermentation de cellulose en ethanol [Stephanopoulos, 2007].

systèmes microfluidiques est la possibilité d'une intégration poussée de multiples composants au sein d'une même puce. Cette intégration permet un gain important en débit par des échanges thermiques facilités et le mutiplexage des opérations. Nous verrons tout au cours de cette partie comment cette technologie récente (elle débuta dans les années 1990) apporte de nouvelles solutions et de nouvelles options pour l'étude et la culture des cellules et en particuliers des micro-organismes.

2.1.1.1 Transfert de masse et de chaleur dans les microbioréacteurs

Une homogénéité des conditions environnementales est nécessaire pour s'assurer des meilleurs conditions de culture au sein d'un microbioréacteur.

Mélange Selon le point de vue que l'on adopte et les dimensions du système, cela peut constituer un inconvénient dans l'utilisation de la microfluidique. En effet, une des caractéristiques essentielles de la microfluidique est que les écoulements dans les canaux se font à des nombres de Reynolds bas ($Re < 0,1$ typiquement), c'est-à-dire que les écoulements sont laminaires. Il n'y a donc pas de turbulence qui assurerait un bon mélange et le transport de matière à lieu par diffusion [Tabeling, 2003]. De plus, dans certaines géométries, les écoulements près des parois sont quasi nuls si bien que les micro-organismes auront tendance à pousser près de la paroi.

Dans le cas du chémostat décrit par Groisman et al. les dimensions du réservoir sont assez petites pour que la diffusion des molécules ait lieu en 40s sur la totalité de la chambre. Les échanges ont lieu alors assez rapidement par rapport au temps de division cellulaire. Aussi, la croissance sur la

surface va permettre l'étude de la formation de biofilms [Groisman et al., 2005].

Il peut exister des avantages à la laminarité des écoulements dans les canaux microfluidiques. En effet, cela offre la possibilité de créer des gradients de concentration complexes qui permettent de tester plusieurs concentrations dans la même expérience [Lee et al., 2005]. Pour des réservoirs plus conséquents, la mise en place de moyens de mélange peut s'avérer nécessaire. Pour cela il existe un certain nombre de techniques mécaniques dont deux sont illustrées figure 2.2.

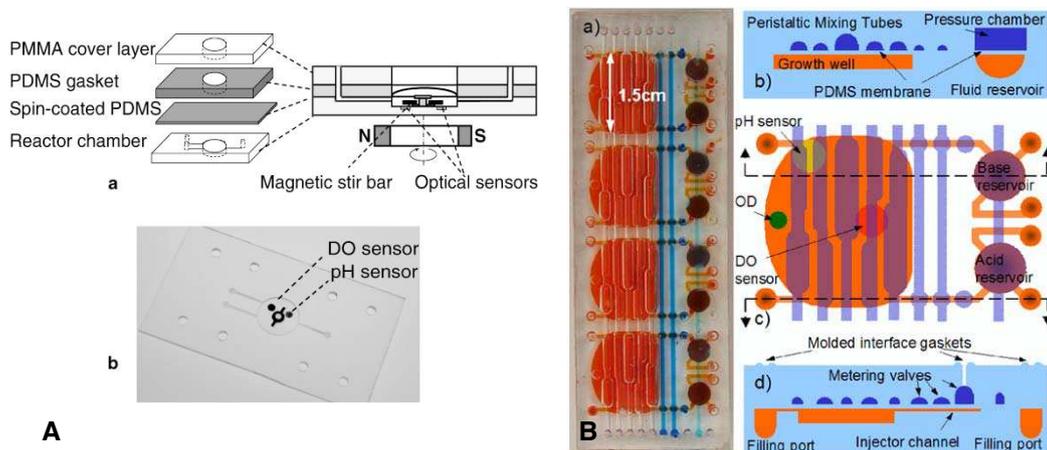


FIGURE 2.2 – Mélange actif dans les microbioréacteurs. A : un barreau magnétique assure le mélange dans le réservoir de culture [Szita et al., 2005] ; B : un système de valves permet un mélange par péristaltisme [Lee et al., 2006].

Un mélange optimal est un compromis entre, assurer des conditions homogènes, un transfert de chaleur et de masse efficace et éviter d'endommager les cellules. L'intensité du mélange dépend alors de la souche étudiée. Par exemple *S. cerevisiae* sédimente plus rapidement que *E. coli* mais est aussi plus robuste et supportera donc un mélange vigoureux [Schäpper et al., 2009]. Des méthodes passives de mélange existent mais ne seront pas abordées ici [Stroock et al., 2002; Tabeling, 2003; Hertzog et al., 2004].

Enfin, dans les systèmes microfluidiques, à mesure que les dimensions diminuent, le rapport surface sur volume augmente et assure ainsi des échanges thermiques rapides et efficaces.

Contrôle des écoulements Les microbioréacteurs peuvent être utilisés dans différents modes. Les cultures en batch constituent, du point de vue des écoulements, un problème simple puisqu'il faut seulement s'assurer que le milieu de culture ne s'évapore pas. Nous aborderons ce problème plus en détail dans la suite de cette partie. Pour les cultures en fed-batch et continues, il faut contrôler les flux d'entrée et de sortie du réacteur. La manière la plus classique de provoquer un écoulement consiste à imposer un débit ou une pression à l'entrée du microcanal ce qui provoque, dans le cas des

réacteurs à volume constant, la sortie de la même quantité de milieu de culture en dehors du réacteur. Cela constitue une solution simple mais qui peut poser des problèmes en terme de parallélisation. L'utilisation d'un seul contrôleur pour tous les systèmes peut être une solution mais cela impose que le débit soit identique dans tous les réservoirs.

D'autre part, du fait des faibles dimensions des microbioréacteurs, l'écoulement d'un liquide à une vitesse donnée provoque une chute de pression importante. Celle-ci varie à débit donnée comme l'inverse du rayon à la puissance 4 pour un capillaire circulaire, et prend donc une grande importance dans les microcanaux et doit ainsi être prise en compte dans la conception des systèmes.

Une solution consiste à utiliser des micropompes et des microvalves actionnés par de l'air comprimé. La figure 2.2.b présente un exemple de système utilisant cette méthode. Cette technique permet ainsi d'avoir des flux individualisés pour chaque réacteur. En contre partie, la complexité du système s'en retrouve accrue. Ce type de système est issue de la technologie de valves développée par le groupe de S. Quake et qui portent son nom [Unger et al., 2000].

Enfin, la réduction des volumes utiles est souvent une chimère du fait des importants volumes morts nécessaires pour introduire un échantillon dans une puce. Ce problème du "world to chip" a été pointé par Ramsey en 1999 [Ramsey, 1999]. Un certain nombre de solutions ont depuis été proposées dont le but est de réduire les volumes morts et d'empêcher les fuites [Fredrickson and Fan, 2004; Kortmann et al., 2009].

2.1.1.2 Fabrication des microbioréacteurs

Les premières méthodes de fabrication des microsystèmes sont issues des technologies silicium de la microélectronique [Manz et al., 1990]. Néanmoins le silicium présente l'inconvénient d'être cher et d'être opaque à la lumière visible et ultra-violette. Le verre quant à lui est transparent mais n'est pas aisé à graver et à coller pour fabriquer des systèmes fermés. La communauté scientifique s'est donc dirigée vers des matériaux moins onéreux et plus facile à mettre en oeuvre dans l'enceinte d'un laboratoire.

Plastique ou élastomère ? Les prototypes de microbioréacteurs sont typiquement fabriqués soit en polyméthylméthacrylate (PMMA) soit en polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce sont les matériaux les plus utilisés de part leur faible coût, leur facilité d'utilisation, leur biocompatibilité, leur non-toxicité et leur bonne transmission de la lumière dans le visible. Les figures 2.2.a et 2.2.b présentent respectivement des microbioréacteur en PMMA et en PDMS. La fabrication de géométries 2D ou 3D est plutôt aisée. Alors que les microsystèmes en PMMA sont fabriqués par injection ou moulage

à chaud [Becker and Heim, 2000; Becker and Gartner, 2000], ceux en PDMS sont fabriqués par la lithographie molle ("soft lithography" en anglais, voir Annexe A). Ces méthodes permettent de fabriquer rapidement et pour des coûts dérisoires des microbioréacteurs de presque toutes les formes et géométries. Un avantage à utiliser des microbioréacteurs "jetables" est que cela réduit les risques de contamination et réduit ainsi les efforts nécessaires à la préparation des réacteurs (stérilisation).

Le PDMS est un élastomère (module élastique $\sim 1,5-1,8 \text{ MPa}$) qui peut se déformer pour des pressions supérieures à quelques milli-bars [Gervais et al., 2006]. Cela peut constituer un avantage par rapport à des polymères plus rigides comme le PMMA (module élastique $\sim 2,3 \text{ GPa}$), pour l'intégrations de valves et micropompes [Unger et al., 2000] mais aussi un inconvénient par exemple pour l'arrêt des flux dans les canaux. En effet, par analogie aux circuits électriques, la flexibilité du PDMS peut être assimilée à une capacitance qui retarde la relaxation du système (cet effet n'est vrai que dans le cas où les flux sont contrôlés en débit et non en pression).

Aération/évaporation L'aération est un élément essentiel pour les cultures aérobies. Le PDMS est un polymère perméable aux gaz. Ainsi, une faible membrane permettra l'approvisionnement du dioxygène et le départ du dioxyde de carbone par diffusion, tout en conservant la stérilité de la culture. Le revers de la médaille est que le PDMS est aussi perméable à l'eau, qui peut s'évaporer hors du microbioréacteur. Avec un taux d'évaporation de $5 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ (à 37°C , [Bocazzi et al., 2006]) un réacteur de $100 \mu\text{L}$ sera totalement vidé en 20 heures. On peut toujours augmenter le volume pour que cet effet soit négligeable mais la bulle d'air qui apparaît dans le réservoir à cause de l'évaporation peut perturber de manière significative les mesures à l'intérieur du microbioréacteur. De plus, si ce volume d'évaporation n'est pas connu ou maîtriser alors les taux de dilution des cultures seront faussés. Pour pallier à ce problème, il faut soit empêcher l'évaporation (ou tout au moins la réduire) soit la compenser. Pour empêcher l'évaporation le réacteur est placé dans une enceinte humidifiée ou un incubateur ce qui réduit l'évaporation à une fraction négligeable [Zanzotto et al., 2004] mais cela rend le réacteur moins accessible et nécessite que toute connexion au réacteur passent dans l'incubateur.

Certains auteurs suggère de plonger le microsystème dans de l'eau pendant 3 jours afin de "saturer" le PDMS en eau [Bai et al., 2010]. Toutefois si l'on considère des microbioréacteur de quelques picolitres, comme nous le verrons plus loin, alors l'effet est loin d'être négligeable.

Enfin, une autre solution consiste à compenser passivement l'eau évaporée en connectant la chambre à un réservoir d'eau légèrement surélevé, ce qui provoque une légère surpression (évitant la formation de bulles d'air) mais augmente le risque de contamination [Szita et al., 2005].

Méthodes de détection La croissance et les taux de production des micro-organismes nécessitent un contrôle du pH et de la température. La détection et la mesure d'un certain nombre de paramètres au cours de la croissance est donc crucial pour la compréhension et l'augmentation de la productivité de procédés comme par exemple la fermentation.

En premier lieu, la température est l'un des facteurs de stress principaux d'une culture. Il faut garder en tête que dans les microbioréacteurs le rapport surface sur volume est très élevé, si bien que les transferts et pertes de chaleur sont très rapides. Pour contrôler la température, la méthode la plus simple consiste à placer le système dans une enceinte thermostatée. Cela ne permet pas en revanche de travailler à plusieurs températures pour le criblage en parallèle de plusieurs conditions de culture. Pour ce faire, des composants électroniques de type peltier ou électrodes chauffantes peuvent être placés sur les parois ou en contact avec le réacteur. La mesure de la température pouvant alors être effectuée par des thermocouples placés à l'intérieur du microsystème. Pour un exemple de ce type de mise en oeuvre le lecteur pourra se référer à la thèse de Jacques Goulpeau [Goulpeau, 2006].

Les sondes standard de mesure du pH, de l'oxygène dissout (OD) ou du dioxyde de carbone dissout sont trop encombrantes pour être utilisées dans les microbioréacteurs. Ainsi, les sondes les plus couramment utilisées dans les microsystèmes sont les "optodes" basées sur des capteurs de fluorescence [Papkovsky, 1995] ou des capteurs à semi-conducteurs basés sur la technologie des transistors à l'état solide (solide state), à effet de champ (field effect) ou sensible aux ions (ion sensitive) [Maharbiz et al., 2003; Kensy et al., 2005]. Ces micro-sondes sont non-invasives, de dimensions réduites et peu onéreuses ce qui les rend attractives pour leur utilisation dans les microbioréacteurs. Néanmoins, le choix de ces capteurs dépend de l'expérience considérée. En effet, chaque capteur a sa plage de mesure et de sensibilité qui dépend de la méthode utilisée. Par exemple les optodes sont sensibles au photoblanchiment et leur plage de mesure du pH est entre 2 et 4 avec une précision de 0.01 unité pH. Pour d'autres types de détecteurs la plage sera de 4 à 9 unité pH avec une réponse non linéaire [Kensy et al., 2005]. La figure 2.2 présente deux exemples d'intégration de ces capteurs dans des microbioréacteurs.

Pour finir, la mesure de la concentration de cellules dans le réservoir est de loin la plus importante. Elle ne pose guère de problèmes majeurs du fait que les matériaux utilisés pour la fabrication des microsystèmes sont transparents sur la gamme du visible. La majorité des techniques employées repose sur la loi de Beer-Lambert qui relie la concentration d'objets dans la chambre à l'absorption de la lumière qui la traverse. L'utilisation de fibres optiques permet la miniaturisation à la fois de la source et du détecteur placé dans le microréservoir.

Pour les microbioréacteurs qui utilisent la microscopie, deux autres méthodes de mesure sont

possibles. Le comptage direct des cellules ou le comptage indirect par mesure de la fluorescence des cellules. Cette dernière méthode nécessite d'avoir des souches marquées par des rapporteurs fluorescents stables au cours du cycle cellulaire. Connaissant le volume du microréservoir, on a accès à la concentration de cellules.

2.1.2 Etat de l'art des microbioréacteur et leur applications

Ces dix dernières années, les progrès dans la conceptions de microbioréacteurs ont suivi les progrès et l'essor exponentiel de la microfluidique. Nous avons ainsi vu qu'un certain nombre de solutions existait pour miniaturiser les systèmes de cultures et assurer le passage au haut débit. Le but de cette section n'est pas de faire une revue exhaustive de l'ensemble des techniques qui permettent la culture de cellules dans des systèmes microfluidiques. Pour des revues sur le sujet le lecteur pourra se référer à : [El-Ali et al., 2006] ; [Tian and Finehout, 2009]. Nous essayerons de présenter différentes approches d'utilisation des microbioréacteurs selon qu'elles soient tri-dimensionnelles, bi-dimensionnelles voire quasi uni-dimensionnelles.

Microbioréacteurs 3D Nous avons déjà aborder en détail certains de ces bioréacteurs, illustrés à la figure 2.2. Il s'agit de la miniaturisation des bioréacteurs classiques CSTR. La culture se fait à trois dimensions et nécessite un mélange pour homogénéiser les cultures et les conditions environnementales. Boccazzi et al. ont montré qu'avec un suivi en temps réel des paramètres et de la cinétique de croissance de cultures de *S. cerevisiae*, ils pouvaient identifier différents profils d'expression génétique [Boccazzi et al., 2006].

La figure 2.3 représente deux stratégies pour confiner les cellules dans un microréservoir. Les cellules sont chargées dans la chambre en utilisant l'élasticité du PDMS dans le cas c) ou en les injectant par l'ouverture de l'anneau dans le cas a). Dans les deux cas, la chambre est perfusée par l'ouverture en dessous de la chambre qui ne permet pas le passage des cellules mais seulement du milieu. La culture n'est pas agitée mais permet la croissance de cellules (pas nécessairement des micro-organismes) jusqu'au remplissage total de la chambre. La possibilité d'utiliser des gradients de concentrations, et les très faibles vitesses à l'intérieur des chambres ouvre des voies dans le criblage de conditions de croissance optimales pour des cellules sensibles et difficiles à cultiver (les cellules neuronales par exemple). De plus, ce format de réseau de culture peut permettre d'imiter le transport de masse dans des tissus.

Le microchémostat schématisé figure 2.3.b autorise la culture continue de bactéries grâce un réseau de valves et de pompes péristaltiques. Celles-ci permettent à la fois l'homogénéisation de la

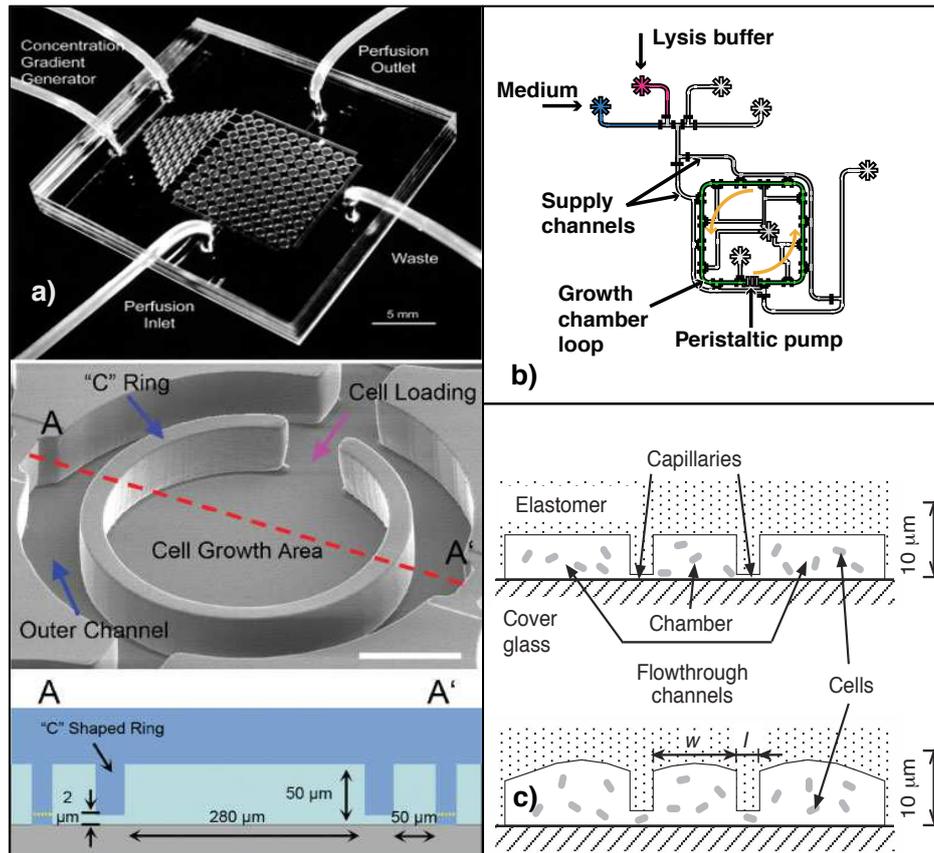


FIGURE 2.3 – Microbioréacteurs en volume. a) Réseau de puits de cultures [Lee et al., 2005]; b) Schéma d'un microchemostat illustré figure 2.1.a, la chambre de croissance est en fait une boucle [Balagadde et al., 2005]; c) Microchemostat développé par l'étude de la croissance bactérienne [Groisman et al., 2005].

boucle (réservoir) de culture et empêche la formation de biofilm le long de la paroi. Associé à la biologie synthétique, ce type de microréacteur a permis l'étude de processus tels que le contrôle de la taille d'une population bactérienne par le quorum sensing ou encore d'imiter un écosystème type proie/prédateur [Balagadde, 2007].

Microbioréacteurs 2D Dans ce type de microbioréacteurs, les cellules sont confinées dans la dimension verticale, les obligeant ainsi à se diviser en monocouche. Cela permet d'avoir un plan focal uniforme pour l'analyse de la croissance en temps réel et en fluorescence, à l'échelle de la cellule unique.

Un autre avantage, outre la possibilité de multiplexer à grande échelle, est que contrairement aux techniques présentées précédemment, l'apport de milieu se fait par diffusion, ce qui réduit le cisaillement que subissent les cellules et qui pourrait influencer la croissance de la culture. La figure 2.4 présente des exemples de cultures 2D. Les travaux de Talia et al. ont permis de montrer le potentiel

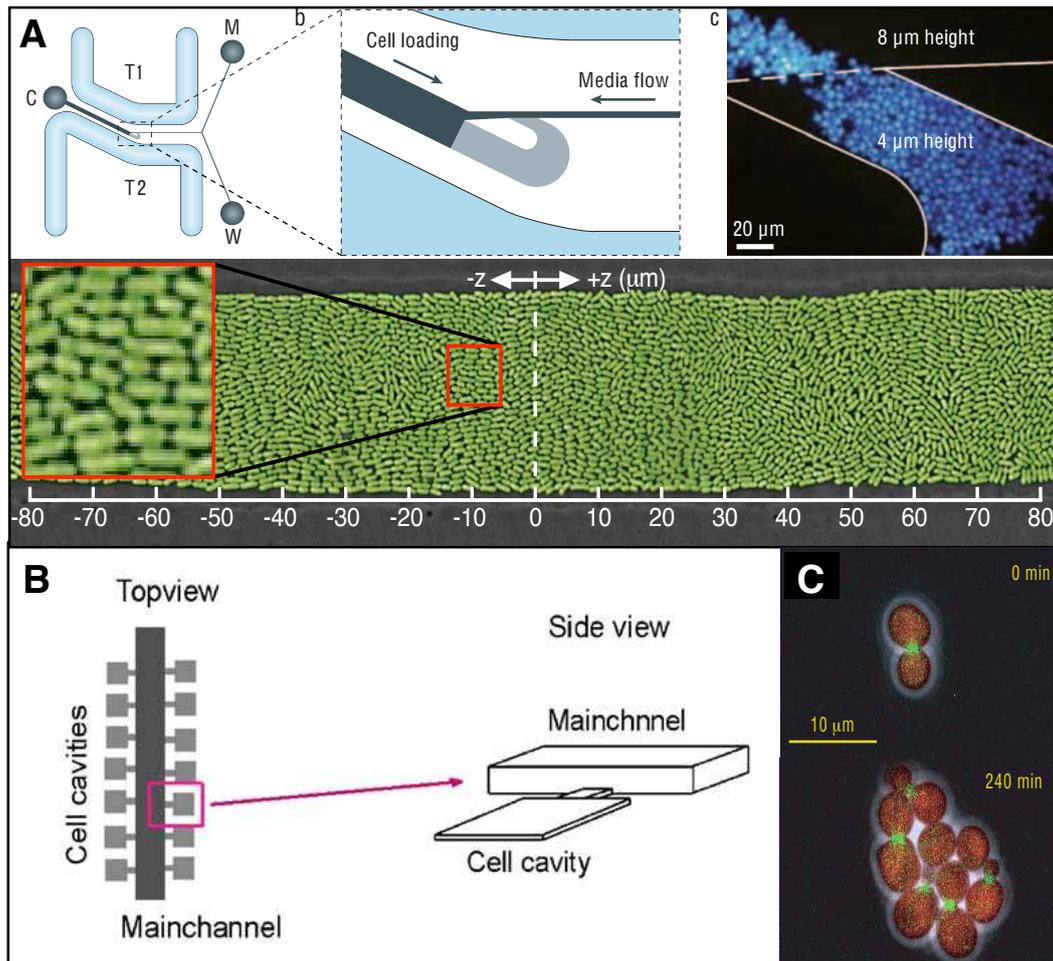


FIGURE 2.4 – Microbioréacteurs et croissance à 2D. A : Tesla Microchémostat. En haut, au centre, schéma de la boucle dans laquelle les cellules sont cultivées. En haut à droite, croissance de levures, l'épaisseur de la boucle est de $4\mu\text{m}$ [Cookson et al., 2005]. En bas, croissance de bactéries, l'épaisseur est de $1\mu\text{m}$ [Volfson et al., 2008] ; B : Réseau de cavités pour la croissance en monocouche de levure, épaisseur $5\mu\text{m}$ [Luo et al., 2009] ; C : Images composite (contraste de phase et fluorescence) de la division en monocouche de *S. cerevisiae* [Talia et al., 2007].

de la culture en monocouche en analysant de manière minutieuse le cycle cellulaire de *S. cerevisiae* à l'échelle cellulaire avec un couple de marqueurs fluorescents. Il ont pu montrer ainsi comment la variabilité ("bruit") dans l'expression génétique et le contrôle de la taille étaient responsable de la variabilité dans la division cellulaire [Talia et al., 2007].

Ce type d'approche permet aussi de suivre la filiation entre les individus rendant accessible des informations tels que la transmission de certains caractères par l'épigénétique [Charvin et al., 2008; Rowat and Weitz, 2009]. Toutefois, comme pour la croissance dans une cavité, la croissance est limitée à la confluence des cellules. Un suivi sur plusieurs jours reste donc difficilement accessible.

Le Tesla microchémostat, appelé ainsi par analogie avec la diode Tesla [Bendib and Francais, 2001], permet de suivre une croissance exponentielle sur plusieurs générations de levures ou de bac-

téries. Lorsque la boucle, dont l'épaisseur est réduite à une taille inférieure à celle des cellules pour les confiner, est pleine, le trop-plein de cellules peut s'échapper en dehors de la boucle par la zone de $8\mu\text{m}$ d'épaisseur. Cela permet de poursuivre la croissance exponentielle même quand la boucle est pleine. Volfson et al. ont pu montrer en utilisant le Tesla chémostat une organisation spatiale sous forme nématique de *E. coli* lorsque la bactérie croît jusqu'à confluence, illustrant la biomécanique de populations denses de cellules (FIG. 2.4.A milieu ; [Volfson et al., 2008]).

Enfin, la figure 2.4.B illustre le multiplexage possible pour des croissances à 2 dimensions. Comme dans le cas du Tesla chémostat, la cavité, moins épaisse qu'une cellule, est remplie par une surpression qui gonfle le PDMS suffisamment pour que les cellules puissent entrer dans la cavité. La simplicité de fabrication de tels microbioréacteurs, rend leur utilisation très attrayantes.

Microbioréacteurs 1D Si l'on confine les cellules encore d'une dimension, celles-ci sont obligées de se diviser en ligne. C'est ce qu'ont réalisé Balaban et al. en moulant dans du PDMS des sillons dont la largeur correspond à la largeur d'une cellule de *E. coli* (FIG. 2.5.a).

Les auteurs ont pu montrer que la persistance chez les bactéries est liée à une hétérogénéité pré-existante de l'expression génétique et à l'aide d'une modèle mathématique ils ont pu décrire le phénomène [Balaban et al., 2004].

La linéarité des sillons rend facile la filiation des cellules comme les asques ont permis d'élucider les mécanismes de l'hérédité mendélienne [Davis and Perkins, 2002]. Cette méthode est utilisée aussi par Rowat et al. dans une géométrie légèrement modifiée pour étudier l'épigénétique chez *S. cerevisiae* en suivant les niveaux d'expression des protéines sur plusieurs générations [Rowat and Weitz, 2009]. Si le système en multicouches développé par Balaban et al. est compliqué et difficile à assembler, le système de Rowat et al. a pu profiter des avancées de la microfluidique pour le rendre simple à fabriquer et utiliser, permettant le suivi de plusieurs centaines de colonies sur 5 à 8 générations.

Micro-gouttes Pour finir, isolons les cellules un peu plus. En confinant les cellules dans une micro-goutte, Brouzes et al. ont pu réaliser un test de viabilité qui démontre la possibilité de réaliser des tests à très haut débit à l'échelle de la cellule unique (FIG. 2.5.b). La plateforme microfluidique présentée permet d'étudier 500 compartiments par secondes avec une viabilité de 4 jours dans les micro-gouttes pour des cellules de mammifère [Brouzes et al., 2009].

Les travaux de thèse de Wang au MIT ont montré en utilisant la même plateforme, la détection et la sélection de levures pouvant métaboliser les pentoses ou ayant une activité catabolique accrue, en fusionnant des gouttes contenant des levures et des gouttes contenant des réactifs enzymatiques

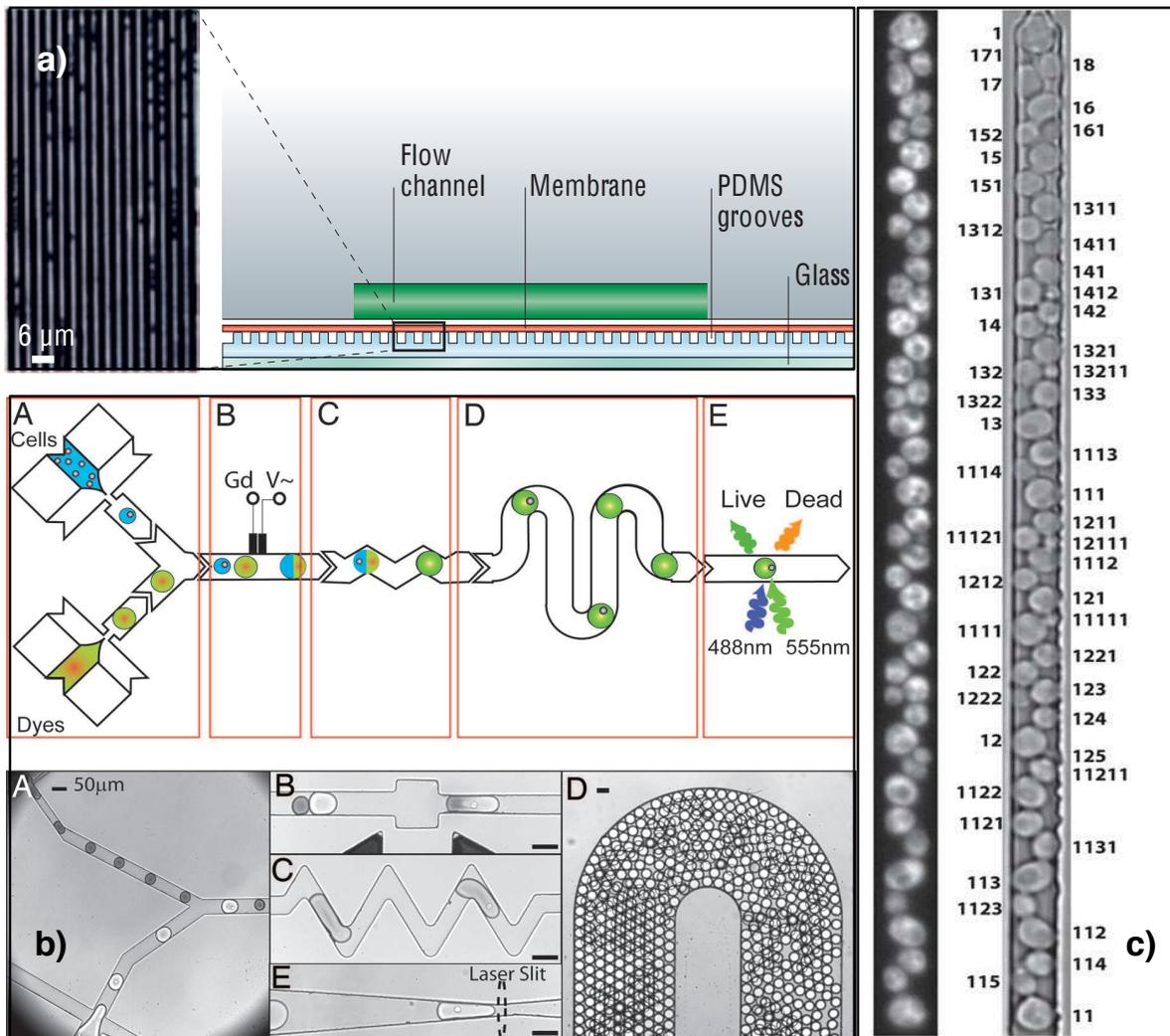


FIGURE 2.5 – Microbioréacteurs uni-dimensionnels et micro-gouttes. a) Système microfluidique pour l'analyse de la persistance chez *Escherichia coli* [Balaban et al., 2004]. Test de viabilité sur puce microfluidique. Intégration de 5 modules manipulant séquentiellement des micro-gouttes [Brouzes et al., 2009] ; c) Suivi de la filiation et du niveau d'expression des protéines pour l'analyse de l'épigénétique [Rowat et al., 2009] ;

pour la détection de l'éthanol [Wang, 2009]. Toutefois, la fuite l'éthanol dans l'huile présente un inconvénient majeure pour cette méthode de détection. Nous verrons l'apport de notre approche dans ce domaine.

Ces exemples illustrent un pan de la microfluidique en plein boom depuis 10 ans. La microfluidique de gouttes ou digitale permet la manipulation de microréservoirs de quelques picolitres à une dizaine de nanolitres [Teh et al., 2008]. Ce format permet d'isoler des réactions ou des objets, comme les réactions biochimiques sont compartimentées dans la cellule [Tawfik and Griffiths, 1998]. Toutefois, la diminution drastique de la taille des microréacteurs implique une augmentation du rapport surface/volume tel que les effets de surfaces sont loin d'être négligeables. Mais la limitation la plus

importante de cette technologie réside dans la difficulté de mise en oeuvre qui nécessite un savoir-faire important de l'utilisateur.

Nous avons vu les progrès de la miniaturisation des bioréacteurs grâce aux apports technologiques offerts par la microfluidique : du multiplexage des méthodes de culture classiques à l'analyse haut débit de cellules uniques. Les méthodes de culture 3D sont robustes pour mesurer la croissance et les paramètres métaboliques de populations de micro-organismes. Les méthodes de culture bi-dimensionnelles et uni-dimensionnelles, permettent le suivi de la croissance de colonies issues de cellules uniques mais ne donnent pas accès à l'activité métabolique car contrairement aux microbio-réacteurs 3D, aucune mesure des solutés ou produits n'est réalisée *in situ*.

La compartimentalisation des cellules dans des micro-gouttes donne accès à l'activité sécrétoire des cellules et donc potentiellement au métabolisme. Toutefois, contrairement à la méthode présentée (FIG. 2.5.b), qui mesure le contenu d'une goutte à un instant t , nous voulons pouvoir réaliser un suivi cinétique. Nous proposons donc dans la prochaine partie une approche 2D de la microfluidique digitale qui permet à la fois de compartimentaliser la croissance de microcolonies et d'assurer en même temps la détection de l'activité sécrétrice au cours du temps.

2.2 Réseau de microbioréacteurs

Nous présenterons des systèmes qui permet l'analyse à haut débit de la croissance de colonies ou de processus biologiques à l'intérieur de microbioréacteurs. Cette approche repose sur la création d'un réseau bi-dimensionnel de gouttes. Après une description de la fabrication des microbioréacteurs, nous verrons les méthodes d'arrêt des microbioréacteurs en un réseau. Enfin, nous étudierons la stabilité et les phénomènes de transport qui peuvent se produire entre les compartiments.

2.2.1 Fabrication des micro-gouttes

L'ensemble des micro-gouttes précédemment décrites constitue une émulsion dite "inverse", c'est-à-dire la dispersion d'une phase aqueuse (milieu de culture contenant les levures) dans une phase continue non-miscible (huile) via la création d'interfaces [Leal-Calderon et al., 2007]. Créer de la surface coûte de l'énergie : γA avec γ , l'énergie (tension) de surface en J/m^2 (N/m) et A , la surface formée. Il est donc nécessaire de fournir de l'énergie au système pour faire des micro-gouttes. Le tableau 2.2 présente les différentes techniques utilisées pour produire des émulsions ainsi que les tailles accessibles.

TABLE 2.2 – Techniques d'émulsification et les tailles accessibles [Leal-Calderon et al., 2007].

Méthode d'émulsification	Tailles typiques
Homogénéiseur haute pression	50nm-5 μ m
Spontanée	~100nm
Inversion de phase	$\leq 1\mu$ m
Membrane	0.2-100 μ m
Microcanaux	10-100 μ m
Cisaillement contrôlé	1-15 μ m

Nous nous concentrerons sur l'application de forces de cisaillement (2 dernières lignes).

2.2.1.1 Application d'un cisaillement contrôlé

Généralement, l'émulsification se décompose en deux étapes successives. Une étape de dispersion-mélange, que l'on appelle pré-émulsification qui va conduire à une simple mise en suspension de gouttelettes de phase dispersée dans la phase continue (gouttes de l'ordre de 100 μ m), puis une étape d'homogénéisation dont le but est de réduire la taille des gouttes et de les rendre monodisperses, *i.e* avec une distribution de tailles de quelques pour cents.

L'application d'un cisaillement sur une goutte d'émulsion provoque son allongement puis sa rupture. Cette observation a mené Taylor à définir le nombre capillaire Ca comme le ratio de la contrainte de cisaillement σ sur la pression de Laplace dans une goutte de rayon R ($P_L = \frac{2\gamma}{R}$) tel que :

$$Ca = \frac{2\sigma}{P_L} \quad (2.1)$$

Lorsque ce nombre excède une valeur critique Ca_{cr} la goutte se rompt [Taylor, 1934]. Ca_{cr} dépend du ratio p des viscosités entre la phase dispersée et la phase continue.

$$p = \frac{\eta_d}{\eta_c} \quad (2.2)$$

La figure 2.6 présente deux techniques qui permettent de cisailer une émulsion afin d'augmenter l'homogénéité en taille de celle-ci. Est aussi illustré l'instabilité de Rayleigh qui est l'un des mécanismes responsables du fractionnement de grosses gouttes en gouttes plus petites. Les gouttes sont étirées en de longs cylindres qui deviennent instables à cause de fluctuations de l'interface et se rompent à partir d'un diamètre critique (il devient plus favorable énergétiquement de former des gouttes). On fonction de la géométrie et à partir de l'équation 2.2, on peut estimer la taille des gouttes que l'on peut obtenir par cisaillement entre deux lames de verre :

$$R_g = Ca_{cr} \frac{\gamma e}{\eta_c \nu}$$

avec ν , la vitesse de déplacement de la lame supérieure $\sim 1 \text{ cm.s}^{-1}$; e , la taille caractéristique est donnée par l'espacement de $12.5 \mu\text{m}$ entre les lames ; η_c , la viscosité de la phase continue égale à 20 mPa.s^{-1} ; γ , la tension de surface entre l'huile (contenant un tensioactif dont nous verrons le rôle plus loin) et l'eau $\sim 5 \text{ mN.m}^{-1}$ et Ca_{cr} , le nombre capillaire critique estimé à 0.01 pour la formulation utilisée, $p = 0.05$ [Mabille et al., 2003]. On obtient un rayon moyen des gouttes de $5 \mu\text{m}$. En ce qui concerne la polydispersité de l'émulsion, il est plus difficile de l'évaluer. Mais il suffit de regarder la figure 2.7.a pour se convaincre que la distribution de tailles est étalée.

Les méthodes de cisaillement contrôlé décrites dans cette partie ne permettent pas d'accéder à des gouttes de taille supérieure à une vingtaine de microns (TAB. 2.2). Pour avoir une émulsion monodisperse il faut appliquer des cisaillements suffisants qui imposent une diminution de la taille des gouttes. Une petite taille des microbioréacteurs peut être un avantage pour certaines réactions biochimiques dont le prix des réactifs est limitant mais s'avère contraignante pour la culture de certaines cellules. Par exemple si l'on place une levure dans une goutte de $15 \mu\text{m}$ de diamètre, cela correspond

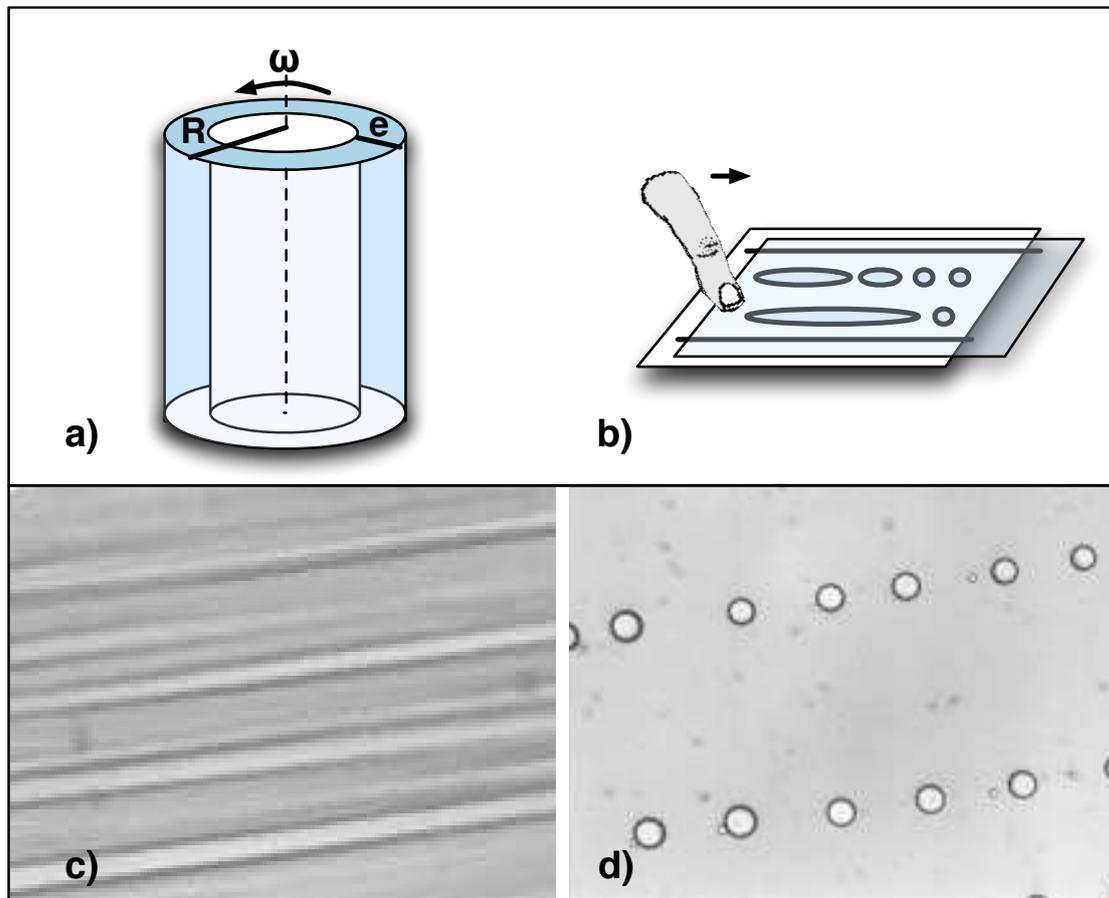


FIGURE 2.6 – Cisaillement contrôlé de gouttes d'émulsion. a) Schéma du rhéomètre de Couette : la paroi du cylindre externe tourne autour d'un cylindre interne fixe exerçant une contrainte $\sigma = \eta_{eff} \frac{\omega R}{e}$ où η_{eff} est la viscosité effective de l'émulsion, dominée par la plus forte viscosité des deux phases et $e \sim 100 \mu m$; b) Schéma du cisaillement simple pour la production d'émulsion : la pré-émulsion est cisailée entre deux lames de verres séparées par un fil de $12.5 \mu m$, la contrainte dépend de la vitesse de déplacement des lames [Sylvestre, 2007] ; c) et d) Mécanisme de rupture : les gouttes sous cisaillement s'étirent en cylindre pour se rompre par l'instabilité de Rayleigh en gouttes alignées de taille identique [Mabille et al., 2003].

à une concentration de $5,8 \cdot 10^8$ cellules/mL soit une DO de 58 au spectromètre qui correspond à une concentration bien au-delà de la phase stationnaire (Fig. 1.6). En d'autres termes, il n'y aura pas assez de nutriments pour permettre plus d'une ou deux divisions.

Enfin, la monodispersité est un caractère très important qui permet d'avoir des microréservoirs de dimensions identiques. L'utilisation de la microfluidique va nous permettre de produire des émulsions monodisperses de tailles contrôlées.

2.2.1.2 Emulsification en micro-canaux

Nous avons vu précédemment que les effets inertiels étaient négligeables dans les canaux microfluidiques du fait de leur petites dimensions ($Re < 1$). Nous allons voir dans cette partie comment

l'interaction entre deux fluides immiscibles peut être utilisée pour introduire des instabilités et des non-linéarités à l'origine de la formation de gouttes dans les micro-canaux. Ceux-ci sont réalisés dans du PDMS par la méthode de lithographie molle (voir Annexe A). Les gouttes produites font de quelques femtolitres à quelques nanolitres avec une polydispersité de 1 à 3% (définie comme l'écart quadratique moyen sur la taille moyenne d'une goutte).

Les méthodes microfluidiques d'émulsification sont soit passives soit actives. La plupart sont passives, ce sont celles que nous étudierons. Elles reposent sur l'applications de flux pour déformer l'interface et promouvoir la croissance d'instabilités.

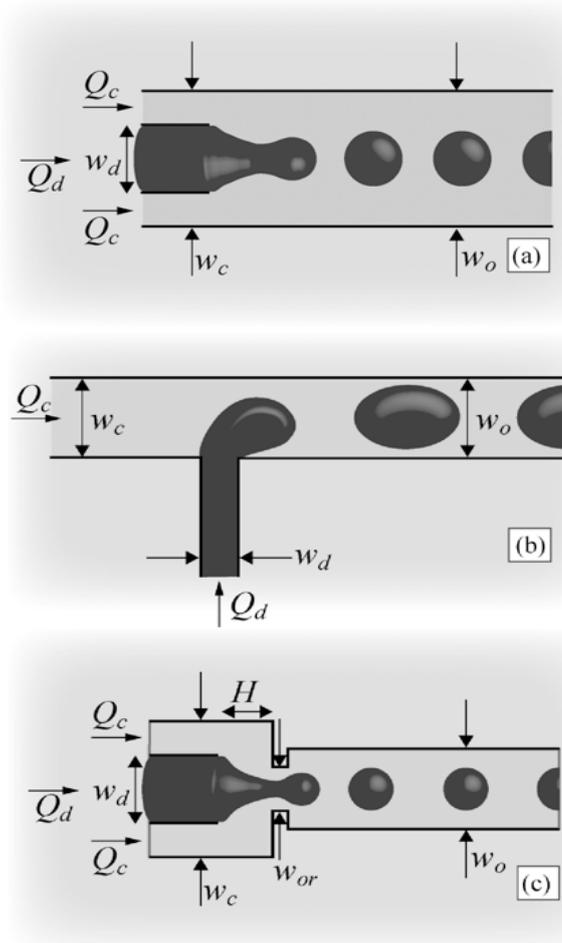


FIGURE 2.7 – Illustration des principales géométries utilisées pour l'émulsification en microfluidique. (a) Écoulements co-linéaires (co-flowing) ; (b) Écoulements croisés dans une jonction en T ; (c) Écoulement élongationnel dans une géométrie de focalisation de flux (flow focusing) ; Les dimensions des entrées, w_c de la phase continue, w_d de la phase dispersée et des sorties w_o sont indiqués. Q_c et Q_d sont respectivement les débits de la phase continue et de la phase dispersée. Extrait de [Christopher and Anna, 2007].

On peut regrouper les méthodes passives en trois catégories selon la topologies des flux dans la zone de production des gouttes : (i) rupture dans des écoulements co-linéaires (FIG. 2.7.a), (ii)

rupture dans des écoulements croisés (Fig. 2.7.b) et (iii) rupture dans un écoulement élongationnel (Fig. 2.7.c). De manière générale, les écoulements de la phase continue et de la phase dispersée sont contrôlés indépendamment soit en pression soit en débit. Il existe une différence de comportement selon la méthode d'injection choisie [Ward et al., 2005]. Nous nous focaliserons sur le contrôle en débit par des pousses-seringues, qui est la méthode que nous avons utilisée.

La géométrie de l'intersection où les deux phases se rencontrent, les débits et les propriétés des liquides (tension de surface, viscosités) déterminent les contraintes locales qui déforment l'interface et conduisent à la production de gouttes. La taille des gouttes est déterminée, comme dans le cas du cisaillement contrôlé, par la compétition entre la pression due aux contraintes de cisaillement et la pression capillaire qui résiste à l'étirement.

Ca est typiquement compris entre 10^{-3} et 10^1 dans la plupart des configurations utilisées pour l'emulsification. On retrouve le nombre sans dimension p qui compare les viscosités des deux phases. On comprend intuitivement que si la phase continue est plus visqueuse, elle exercera un cisaillement plus important sur la phase dispersée et réciproquement si la phase dispersée est plus visqueuse elle sera plus difficile à étirer. On peut définir deux autres paramètres qui ont leur importance dans la formation des gouttes : $q = \frac{Q_d}{Q_c}$ et un ratio géométrique $x = \frac{w_d}{w_o}$.

Nous présenterons les deux géométries les plus couramment utilisées pour générer un flux de microgouttes de façon reproductible et contrôlée : la jonction en T et la géométrie de focalisation de flux.

Jonction en T Il s'agit de la première technique pour générer des gouttes de façon périodique et contrôlée au sein de microcanaux, proposée par Thorsen et al. et illustré figure 2.8 [Thorsen et al., 2001]. La phase continue circule dans un canal principal. La phase dispersée est amenée dans le canal principal par un canal secondaire perpendiculaire à celui-ci. Elle envahit le canal principal et une goutte finit par se détacher.

Trois régimes peuvent être distingués en fonction du ratio des dimensions des canaux x et du ratio des débits q . Quand $x \ll 1$ et que le nombre capillaire est suffisamment grand, les gouttes sont formées avant qu'elles ne puissent bloquer le canal et leur formation est entièrement due au cisaillement. C'est le régime d'égoutement ("dripping regime" en anglais ; [Tice et al., 2003]). Un second régime de pincement ("squeezing") est observé pour $x \sim 1$ et pour un nombre capillaire assez faible [Garstecki et al., 2006]. La goutte obstrue le canal à mesure qu'elle grossit, diminuant par la même occasion le flux de la phase continue autour de la goutte. La réduction de l'espace par lequel peut s'écouler la phase continue provoque l'augmentation drastique de la pression exercée en amont

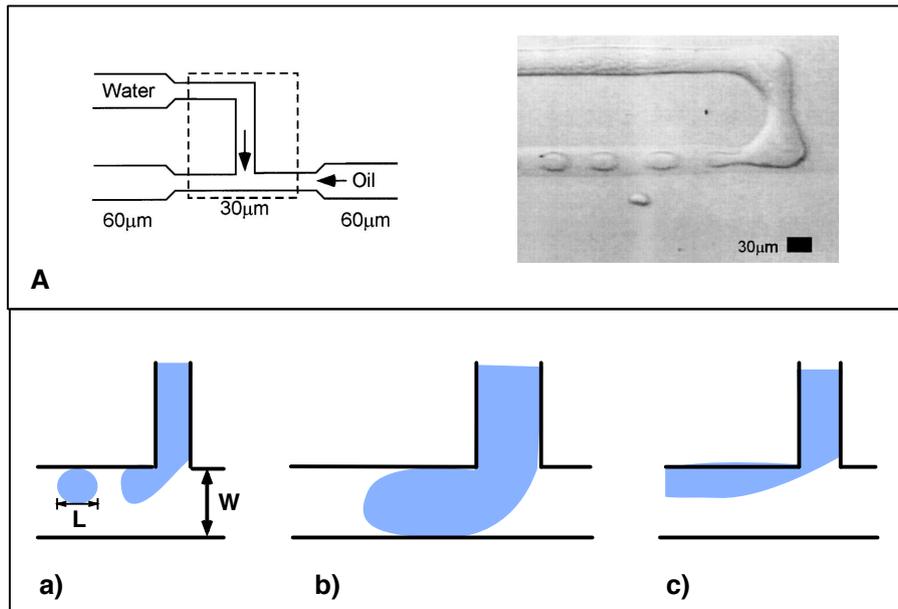


FIGURE 2.8 – Jonction en T. A Géométrie utilisée pour la formation de gouttes à une jonction en T (extrait de [Thorsen et al., 2001]); Régimes accessibles dans la géométrie en T. a) Régime de "dripping" ; b) Régime de "squeezing" ; c) Régime de "co-flow". L est la longueur d'une goutte et W la largeur du canal d'injection de la phase continue.

de la goutte, forçant l'interface au niveau de l'arrivée de la phase dispersée à se rompre en goutte. Dans ces deux régimes, la taille des gouttes L , dépend du ratio q des débits (phase dispersée/phase continue) et peut être estimée [Garstecki et al., 2006] :

$$\frac{L}{W} \sim 1 + q$$

A mesure q diminue, on transite vers la formation des deux flux parallèles stables, c'est le régime de flux co-linéaires. Ce régime est retardé si p diminue, *i.e.*, si la viscosité de la phase continue augmente.

"Flow-focusing" Cette géométrie a été suggérée par Ganan-Calvo dès 2001 dans une géométrie cylindrique (en capillaires) pour la formation de bulles d'air dans un liquide [Ganan-Calvo and Gordillo, 2001]. Ce n'est cependant qu'en 2003 qu'elle est appliquée dans une géométrie plane microfabriquée et pour la formation de gouttes d'eau dans l'huile [Anna et al., 2003]. La phase dispersée est étirée entre deux flux opposés de phase continue et conduit à un jet qui se rompt en gouttes soit dans la constriction ou en dehors de la constriction.

Il existe principalement deux régimes : un régime d'égoutement ("dripping") et un régime de formation de goutte par rupture d'un long jet ("jetting"). Ces deux régimes sont illustrés figure 2.9. La transition entre ces deux régimes dépend de l'intensité des débits et des pressions imposées soit

de Ca et q . Contrairement, à la géométrie précédente, il n'existe pas de modèle simple qui prédise la taille des gouttes en fonction des paramètres de contrôle.

Dans le régime de "dripping" les gouttes se rompent à l'intérieur ou très proche de la constriction et l'interface après rupture demeure à la même place dans la constriction. Dans ce régime, si le nombre capillaire est assez élevé, les gouttes ont un diamètre plus petit que la dimension de la constriction et sont très monodisperses (polydispersité $<2\%$). A faible nombre capillaire l'émulsion devient polydispersée [Abate et al., 2009]. Le diamètre diminue à mesure que le nombre capillaire augmente et que le ratio des débits diminue.

Le processus de rupture n'est pas dû à une instabilité capillaire mais à l'inertie des fluides en écoulement [Dollet et al., 2008].

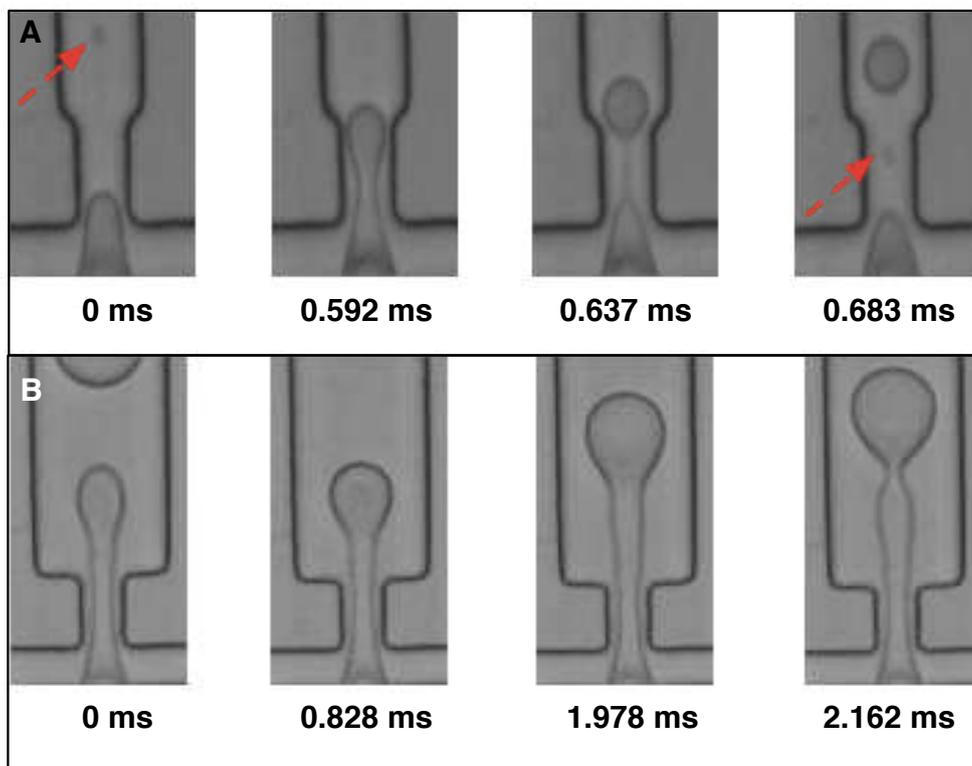


FIGURE 2.9 – "Flow focusing", les deux principaux régime. Les images ont été réalisées à l'aide d'une caméra ultra-rapide. A : régime de "dripping", la goutte se rompt juste une sortie de la constriction avec la formation d'une goutte satellite dans le volume n'excède pas 1% de volume de la goutte principale ; B : régime de "jetting", un jet épais s'étend au-delà de la constriction pour former une goutte dont le diamètre est supérieur à la dimension de la constriction.

A mesure que le nombre capillaire augmente, une transition vers le régime de "jetting" s'opère. Dans ce régime, la phase dispersée s'étend en un long jet hors de l'orifice sur une distance d'au moins 3 fois la taille de la constriction. L'interface du jet présente des ondulations et croît jusqu'à sa rupture

en gouttes. Les gouttes résultantes, proportionnelles à la taille du jet, sont plus grosses que celles obtenues dans le régime de "dripping" et sont beaucoup moins uniformes en taille car la position de l'interface après rupture n'est pas fixe [Utada et al., 2007].

Il n'existe pas de loi simple pour expliquer les transitions entre les différents régimes, ni pour estimer la taille, la distribution ou encore la vitesse de production en fonction des paramètres de contrôle. En effet, trois autres grandeurs ont été rajoutées par rapport à la jonction en T : la taille de la constriction w_{or} , sa longueur H et largeur du canal de collection des gouttes w_o qui est différent de w_c dans cette nouvelle géométrie. Toutefois, c'est la géométrie que nous avons choisi pour fabriquer nos émulsions. On se plaçant dans le régime de "dripping" on peut produire des gouttes très monodisperses dont la taille caractéristique est donnée par la taille de la constriction. A géométrie et formulation fixée, on peut de manière empirique former des gouttes du volume choisi.

Pour conclure, la différence entre la méthode de cisaillement contrôlé, présentée dans la partie précédente, et la microfluidique digitale est due principalement à des effets de confinement qui permettent, grâce à la géométrie des microcanaux et aux débits, de contrôler les instabilités mises en jeu dans la formation des gouttes. Pour une description plus détaillée des mécanismes de formation des gouttes le lecteur pourra se référer à [Garstecki et al., 2006; Christopher and Anna, 2007; Baroud et al., 2010].

Remarque sur les propriétés de surface des microsystème : mouillage Toute les considérations décrites dans les géométries de jonction T et de "flow focusing" ne sont valables que dans le cas où la phase continue mouille préférentiellement les parois des microcanaux.

En effet, le confinement des liquides fait qu'ils peuvent interagir plus facilement avec les parois, ce qui fait intervenir d'autres énergies interfaciales qui vont affecter le mode de formation des gouttes. Plus les canaux seront petits, plus des effets de compétitions de mouillage interviendront [Dreyfus et al., 2003].

Le mouillage est l'étude de l'étalement d'un liquide sur un solide ou un autre liquide. Il fait intervenir 3 phases, dans le cas étudié figure 2.10.c, l'eau, l'huile et le substrat. Lorsqu'une goutte d'eau est placée sur le substrat en présence d'huile, elle s'étale et forme un angle de contact qui dépend des tensions superficielles entre les différentes phases comme défini par la loi de Young-Dupré [de Gennes et al., 2002]. Dans le cas où θ est nul, on dit que le substrat est mouillé totalement par l'eau, il n'existe plus d'interface entre l'huile et le substrat. Dans le cas $0 < \theta < 180^\circ$, il y a mouillage partielle, c'est le cas représenté figure 2.10. Enfin, si $\theta = 180^\circ$, l'huile mouille totalement la surface, c'est le cas idéal recherché dans nos expériences.

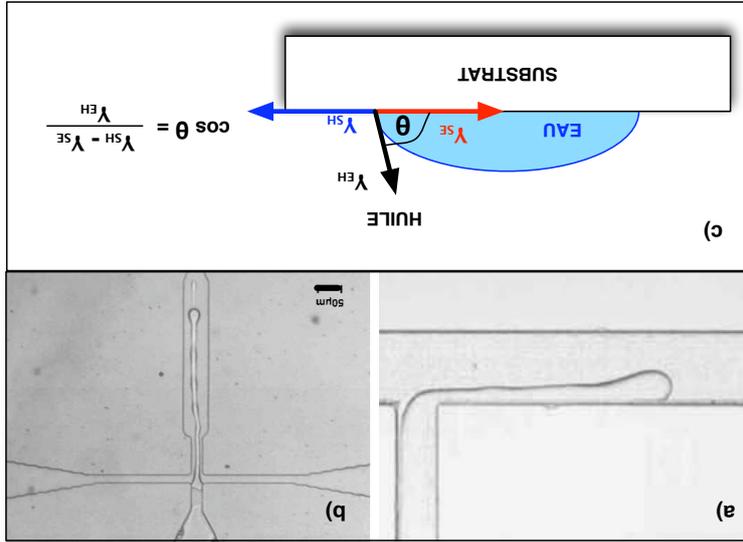


FIGURE 2.10 – Deux exemples de mouillage partielle de la phase dispersée, a) dans une géométrie de jonction en T ; b) dans une géométrie de "flow focusing". L'échelle représente 50µm ; c) Schéma illustrant la loi de Young-Dupré.

En mouillant les parois, la phase continue "isole" les parois de la phase dispersée et seul la tension de surface entre la phase continue et la phase dispersée interviendra dans les phénomènes capillaires. Pour cela il est préférable "d'amorcer" le système microfluidique avec de la phase continue avant de démarrer la production de gouttes. La figure 2.10 présente deux exemples où la phase dispersée (l'eau) mouille partiellement les parois provoquant l'apparition d'un long jet dont la rupture n'est plus contrôlée, ce qui se traduit par une forte polydispersité de l'émulsion ainsi formée.

Il existe plusieurs façon de modifier les conditions de mouillage. Les tensioactifs (surfactants) abaissent les énergies de surface en se plaçant à l'interface. Nous verrons le rôle indispensable qu'ils jouent dans la stabilisation des émulsions. Une autre solution consiste à modifier la surface. Ainsi Jin al. ont joué sur la rugosité du PDMS pour le rendre ultra-hydrophobe [Jin et al., 2005]. La solution que nous avons adoptée, est la modification chimique des propriétés de surface du substrat (PDMS). Dans le cas de la formulation fluoree, un groupement fluore a été greffé au PDMS (voir Annexe A). Dans le cas de la formulation hydrophobe, aucune modification n'est nécessaire car le PDMS est naturellement hydrophobe, mais pose d'autre problèmes comme le gonflement de l'élastomère.

2.2.2 Encapsulation des cellules

Tant que les gouttes ne renferment pas de cellules ou de réactifs biochimiques, ce ne sont pas réellement des microbioacteurs. Nous verrons dans cette section les méthodes d'encapsulation des cellules.

L'étude de la cellule unique est l'une des motivations majeures qui ont poussé les chercheurs ces dernières années à développer des méthodes d'isolation et de séparation des cellules. En effet, les résultats obtenus en moyenne peuvent facilement conduire à une interprétation erronée du fait de la variabilité entre chaque individu, même identiques génétiquement. Nous avons vu que les microbioréacteurs 2D pouvaient adresser ce genre de problème. Et c'est ainsi que Elowitz et al. ont pu distinguer deux sources de variabilité au sein d'une population clonale : le bruit intrinsèque (inhérent à la stocasticité des processus biochimiques internes à la cellule) et le bruit extrinsèque (lié aux microenvironnement à l'intérieur de chaque cellule à un instant donnée) [Elowitz et al., 2002].

Pour une étude complète à l'échelle de la cellule unique, il faut non seulement être capable d'isoler chaque cellule, mais aussi d'étudier un nombre important d'individus. La cytométrie de flux est le premier exemple d'outil développé pour l'analyse de cellules uniques à très haut débit. Elle permet l'étude de plusieurs dizaines de milliers de cellules à la seconde et même le tri dans sa version FACS ("Fluorescence activated cell sorting"). La détection repose sur la fluorescence des cellules qui doivent être préalablement marquées. Pour cette technique, de même que pour la méthode 2D, la détection ne peut se faire sur ce qui est excrété par la cellule. Or ces produits cellulaires peuvent être des marqueurs pertinents du phénotype cellulaire. C'est alors naturellement que le format d'analyse de cellules uniques en goutte est né.

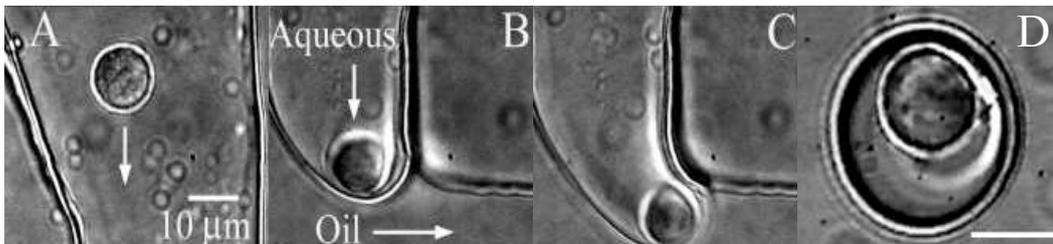


FIGURE 2.11 – Encapsulation d'un lymphocyte B de manière active. A-C : dans une géométrie de jonction en T, une pince optique (laser infra-rouge) est utilisée pour déplacer une cellule dans la solution aqueuse jusqu'à l'interface eau/huile, puis une goutte de solution aqueuse contenant la cellule est détachée par l'application d'un pulse de pression dans la branche secondaire du T, D : résultant en l'encapsulation d'une cellule unique dans une goutte de dimension similaire [He et al., 2005].

La première démonstration d'encapsulation contrôlée de cellules au sein d'une microgoutte est présentée par He et al (figure 2.11 ; [He et al., 2005]). Il s'agit d'une méthode active, nous allons voir les autres méthodes dites "passives" qui reposent seulement sur l'hydrodynamique des fluides mis en jeu. Nous distinguerons une méthode stochastique, de méthodes contrôlées qui permettent l'encapsulation de cellules uniques.

2.2.2.1 Encapsulation stochastique

Considérons un réservoir contenant des cellules. Si ce réservoir est fractionné en petits volumes égaux (gouttes), la probabilité d'avoir n cellules dans une goutte est donnée par la loi de Poisson :

$$p(\lambda; n) = \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \quad (2.3)$$

λ est le paramètre de Poisson qui correspond au nombre de cellules par goutte en moyenne (λ est petit sinon on obtient une probabilité gaussienne).

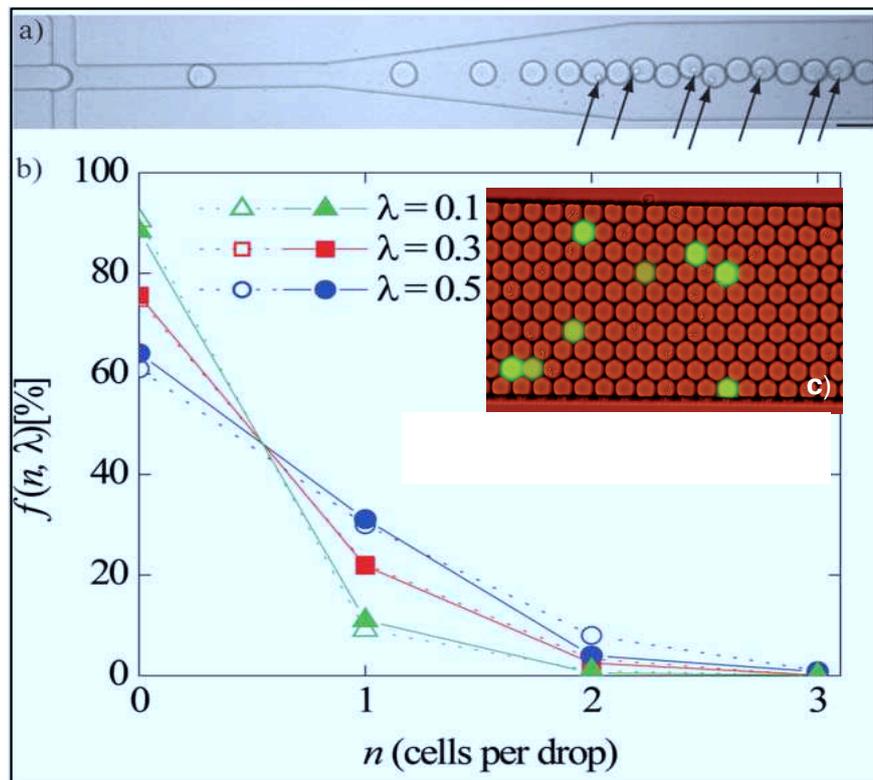


FIGURE 2.12 – Encapsulation de cellules de mammifères individuelles. (a) Encapsulation de cellules dans des gouttes de 33pL . Les gouttes contenant des cellules sont pointées par des flèches ; (b) Distribution de Poisson pour trois concentrations de cellules. Les symboles ouverts sont les valeurs calculées et les symboles fermés sont les données expérimentales [Köster et al., 2008] ; (c) Détection de l'activité de la β -galactosidase chez *E. coli*. Les gouttes vertes sont les microréacteurs contenant des cellules et dont le substrat fluorogénique a été converti en molécules fluorescentes [Baret et al., 2009a].

Nous avons vu qu'une manière de produire des gouttes de manière monodisperse était d'utiliser une géométrie de flow-focusing en régime de "dripping". Connaissant le volume d'une goutte, on peut ajuster la concentration de cellules à injecter dans les microcanaux afin d'avoir principalement une seule cellule par goutte.

La figure 2.12.b présente des expériences d'encapsulation avec des moyennes de cellules par gouttes différentes. Ces résultats coïncident bien avec le modèle statistique. La légère déviation pour $\lambda = 0.5$ peut s'expliquer par des interactions entre les cellules aux concentrations plus élevées, tel que l'on ne peut plus considérer les cellules comme des objets indépendants.

Cette méthode d'encapsulation a été utilisée par Baret et al. pour isoler des cellules de *E. coli* dans des microréservoirs [Baret et al., 2009a]. Cela a permis de réaliser le premier tri à haut débit basé sur l'activité sécrétrice de cellules à la différence du FACS dont le tri repose sur la fluorescence à l'intérieur de la cellule. De la même manière, comme nous l'avons vu précédemment, Brouzes et al. ont pu réaliser un test de viabilité de cellules à haut débit sur puce (figure 2.5.b ; [Brouzes et al., 2009]). Cette expérience illustre la nécessité de n'encapsuler qu'une seule cellule par goutte pour éviter d'avoir par exemple une cellule morte et une cellule vivante dans la même goutte. Cela sous-entend que d'après la loi de Poisson, une majorité des gouttes produites est vide. Pour vaincre cette limitation et pour augmenter le débit d'analyse, des techniques utilisant l'hydrodynamique ont été développées qui permettent de remplir un grand nombre de gouttes avec une cellule unique.

2.2.2.2 Encapsulation contrôlée par l'hydrodynamique

En jouant sur la géométrie des canaux de leur dispositif microfluidique et les débits ($Ca \sim 0.5$), Chabert et al. imposent un régime de "jetting" à l'origine d'un long jet fin qui s'étant dans le microcanal de collection (Fig. 2.13.b). Ce jet se rompt en gouttes de dimensions inférieures à celle d'une cellule. Lorsqu'une cellule passe dans le jet, elle perturbe celui-ci, induit sa rupture en un endroit différent du point habituel d'équilibre et se retrouve encapsulée seule dans une goutte [Chabert and Viovy, 2008].

La taille des gouttes formées ne permet statistiquement l'encapsulation que d'une seule cellule par goutte. Le diamètre de la goutte est au maximum égal à deux fois celui d'une cellule soit un rapport 1/8 en volume, ce qui représente un état très confiné de tel sorte que le temps de survie des cellules à l'intérieur des gouttes est extrêmement limité. Il serait nécessaire de fusionner ces gouttes avec des gouttes contenant du milieu de culture pour pouvoir exploiter cette technique pour l'étude de la croissance en goutte.

Toujours dans une géométrie de flow focusing, Edd et al. ont démontré qu'ils pouvaient vaincre la statistique de Poisson pour l'encapsulation de cellules en organisant les cellules dans la direction de l'écoulement de telle sorte qu'elles arrivent dans la constriction à la même fréquence que celle de génération des gouttes (Fig. 2.13 ; [Edd et al., 2008]). L'auto-organisation des cellules est due à des interactions hydrodynamiques entre les cellules du fait d'un débit suffisant et d'un rapport d'aspect

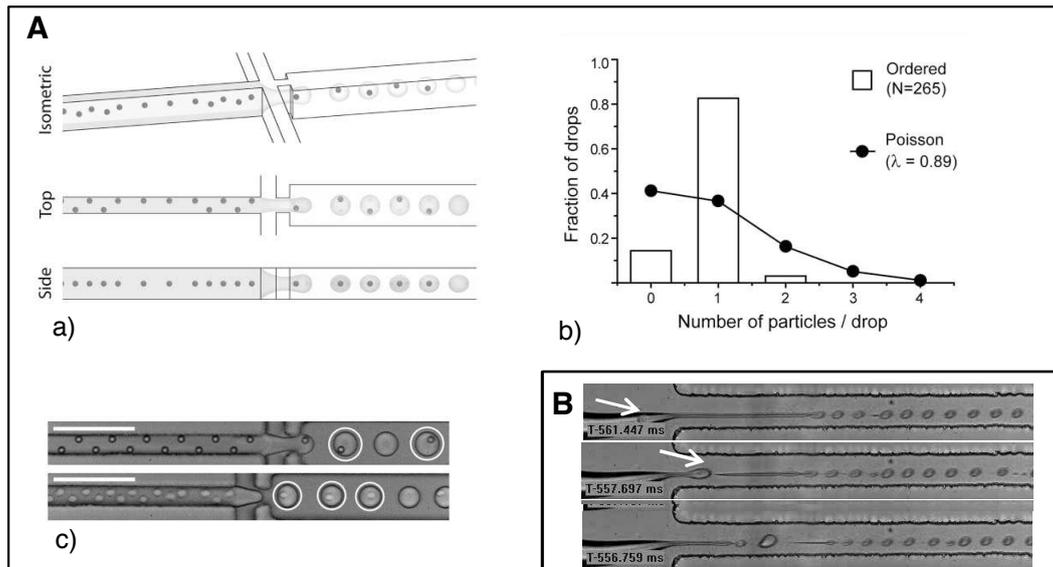


FIGURE 2.13 – Encapsulation contrôlée. A : Encapsulation ordonnée [Edd et al., 2008]. (a) Schéma de la géométrie des canaux qui permettent des interactions hydrodynamiques. Ces interactions provoquent une auto-organisation des particules le long d'un côté du microcanal ou une alternance en diagonal. L'espaceur uniforme dans la direction de l'écoulement conduit à la formation de gouttes contenant une particule unique lorsque la rupture des gouttes a lieu à la même fréquence que l'arrivée des particules dans la constriction ; (b) cette méthode permet d'obtenir moins de gouttes vides et d'enrichir la population en gouttes ne comportant qu'une seule particule/cellule ; (c) on observe cette auto-organisation aussi bien pour des particules (*en haut*) que pour des cellules (*en bas*). B : Encapsulation passive [Chabert and Viovy, 2008]. La cellule, plus grosse que les gouttes formées "naturellement", perturbe le jet et est encapsulée dans une goutte plus grosse de dimension équivalente à celle de la cellule.

des canaux élevé [Di Carlo et al., 2007].

Cette technique d'encapsulation n'est toutefois pas adaptable à des cellules de taille trop faible. En effet, pour que les interactions puissent se mettre en place et produire de l'auto-organisation, il faut que la dimension la plus petite (la largeur) n'excède pas 2.5 fois la dimension d'une cellule et que la distance de parcours des cellules (longueur du canal) soit suffisante, supérieure à 6 cm. Ces contraintes imposent que la pression dans le circuit serait trop élevée pour un microsystème en PDMS.

De plus, cette méthode est validée pour des objets sphériques et ne fonctionne plus dès qu'il y a des agrégats de cellules. Or, la levure comme le montre la figure 1.1 n'est pas un objet sphérique à cause des bourgeonnements des cellules filles. Pour éviter les agrégats, les cellules sont constamment agitées dans les seringues d'injection à l'aide d'un petit barreau magnétique.

Ainsi, les méthodes contrôlées d'encapsulation ne sont pas adaptées à l'encapsulation de cellules de levure unique pour le suivi de la croissance. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode statistique. Il s'avère que le grand nombre de réservoirs vides se révèle être un atout comme nous le verrons par la suite. Une fois les microbioréacteurs produits, il faut créer le réseau qui va permettre

de suivre au cours du temps les processus biologiques qui s'y déroulent.

Remarque sur la survie des cellules pendant et après l'encapsulation Il est clair que si les cellules sont tuées ou affaiblies par l'encapsulation, les résultats seront faussés. Nous avons déjà discuté du volume final de la goutte comme un facteur à contrôler pour la survie des cellules sur de longues périodes. Deux autres facteurs peuvent être à l'origine d'une diminution de la viabilité des cellules : les forces de cisaillement exercées lors de leur injection dans les microcanaux et la toxicité des tensioactifs utilisés pour stabiliser les gouttes.

La sensibilité des cellules au cisaillement dépend énormément du type de cellule considérée. Dans les expériences d'encapsulation présentées plus haut, les auteurs trouvent des taux de survie entre 85% et 92% [Köster et al., 2008; Edd et al., 2008] pour des cellules de mammifère. La levure étant protégée par une paroi (Fig. 1.1) et ne possédant pas de flagelles susceptibles de se rompre (comme dans le cas de *E. coli*), elle supporte des cisaillements importants.

Clausell-Tormos et al. ont fait une étude de la viabilité des cellules en fonction de différents tensioactifs sur des cellules de mammifère [Clausell-Tormos et al., 2008]. Il s'avère que la majorité des surfactants utilisés sont biocompatibles et ne sont pas toxiques pour les cellules. En ce qui concerne les réactions biochimiques compartimentalisées, le problème est légèrement plus complexe. Du fait du fort ratio surface/volume, les effets d'adsorption des protéines à la surface sont décuplés [Mazutis et al., 2009] et nécessitent le greffage par exemple de groupement type Poly Ethylen Glycol à l'interface [Holtze et al., 2008].

2.2.3 Fabrication du réseau bi-dimensionnel de microbioréacteurs

Nous avons vu qu'il était possible de confiner des cellules (ou des réactions biochimiques) à l'intérieur de gouttes d'émulsion. Ceci permet d'atteindre des niveaux de concentrations de molécules sécrétées par une cellule unique détectables. Pour réaliser un suivi cinétique du signal ou de la croissance des cellules, il faut pouvoir suivre chaque réservoir au cours du temps.

2.2.3.1 Emulsion cristallisable

Une solution consiste à arrêter les gouttes en un réseau 2D en figeant la phase continue, l'huile.

Pour cela, il a utilisé une huile cristallisable dont la température de liquéfaction se situe autour de 40°C. Une émulsion dense (avec une fraction volumique d'eau $\Phi \sim 0.76$) contenant les cellules est

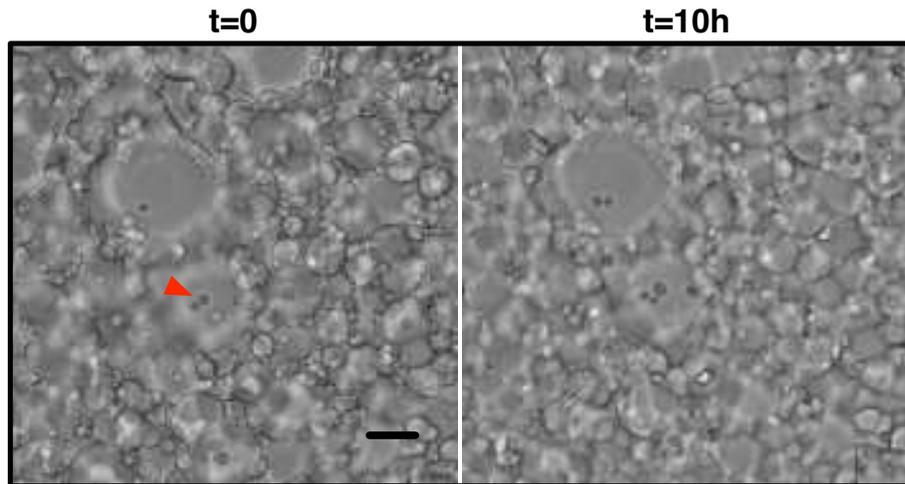


FIGURE 2.14 – Réseau 2D de gouttes pour le suivi de la croissance de *S. cerevisiae*. A : Gouttes de milieu de culture dans une huile cristallisable réalisée par cisaillement entre deux lames. Entre-lame = $12.5\mu\text{m}$, l'échelle représente $20\mu\text{m}$ [Sylvestre, 2007]. La flèche rouge pointe vers des cellules de *S. cerevisiae* encapsulées dans un microbioréacteur.

préparée à 45°C en cisillant deux lames qui sont placées ensuite à 30°C . Le système se fige donnant un réseau 2D de microbioréacteurs comme illustré figure 2.14. Le problème majeur de cette méthode réside dans les changements de température nécessaires au changement d'état du système. En effet, les cellules sont extrêmement sensibles aux écarts de température en général. Aussi, le stress induit au cellule ne peut conduire qu'à des résultats erronés.

2.2.3.2 Pièges à gouttes en PDMS

L'avantage des microsystèmes en PDMS pour piéger des microbioréacteur est que l'emulsification, le stockage et l'incubation peuvent être réalisés sur la même puce dans une enceinte thermostatée. Une première méthode utilisant l'hydrodynamique et une géométrie en U des pièges est illustré figure 2.15.a. Le diamètre du piège est tel que seule une goutte peut rester bloquée [Huebner et al., 2009]. La plupart des gouttes ($>90\%$) passe à travers le réseau de pièges sans être piégée. Cette structure est idéale pour sélectionner un sous-ensemble d'une large population de goutte. Une protéine fluorescente hydrophile (YFP vénéus), qui ne fuit donc pas dans la phase continue, est encapsulée dans les gouttes afin de suivre l'évolution du volume au cours du temps. Les auteurs ont démontré que le volume de la goutte diminuait de façon exponentielle et que cette diminution était proportionnelle au débit d'huile. En travaillant à débit d'huile constant (donc en contrôlant la fuite d'eau dans la phase continue), ils ont pu réaliser l'étude de la cinétique d'une réaction enzymatique sur un grand nombre de gouttes simultanément.

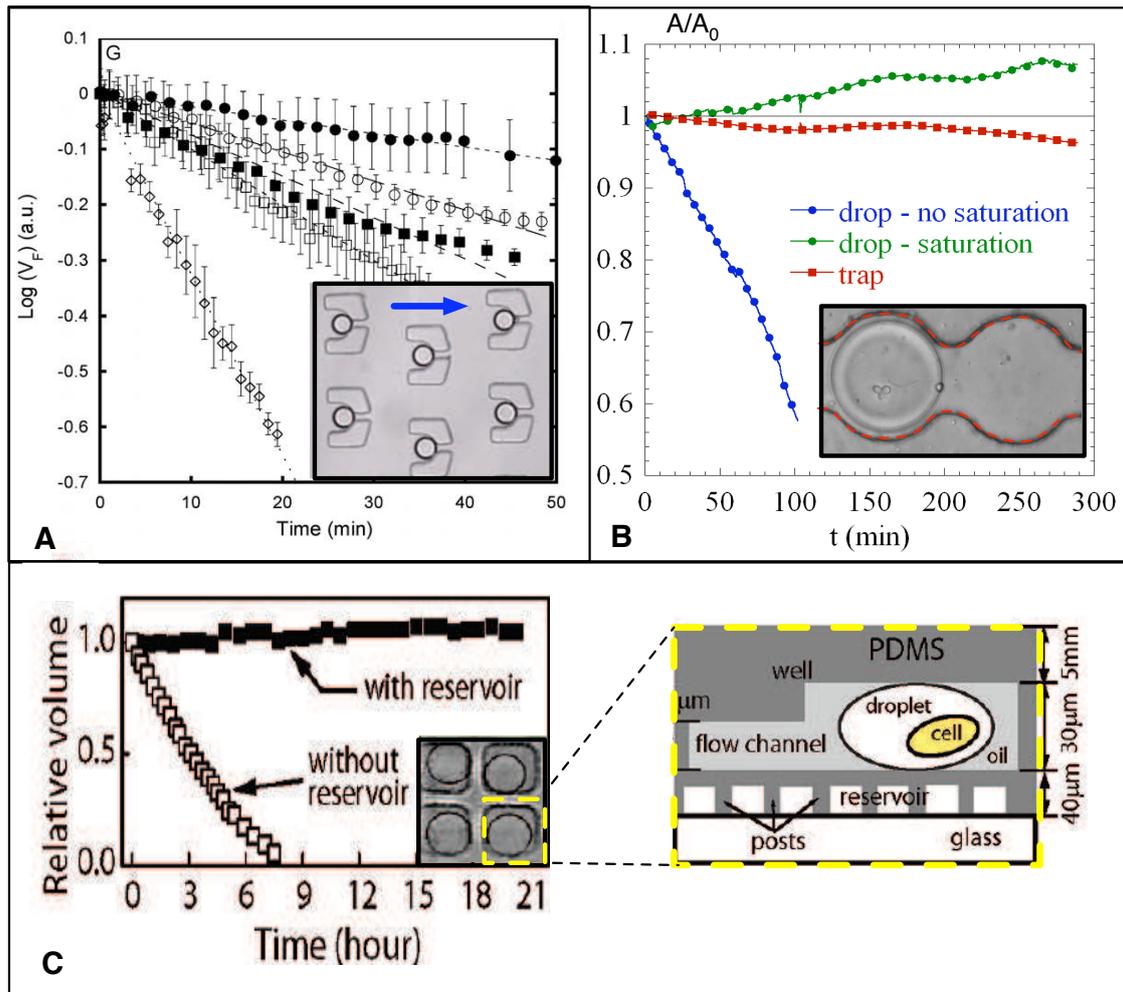


FIGURE 2.15 – Piégeage de gouttes dans des microsystemes en PDMS. (A) Piège en U illustré dans l’insert. La flèche bleue indique le sens de l’écoulement de la phase continue. Les gouttes ont un diamètre moyen de $50\mu\text{m}$. Le graphique montre l’évolution du volume d’une goutte au cours du temps en fonction du débit imposé dans le canal : (\bullet) $0\mu\text{L/hr}$, (\circ) $1\mu\text{L/hr}$, (\blacksquare) $5\mu\text{L/hr}$, (\square) $10\mu\text{L/hr}$, (\diamond) $100\mu\text{L/hr}$. Adapté de [Huebner et al., 2009]; (B) Piège par constriction. Illustré dans l’insert, une goutte de $100\mu\text{m}$ de diamètre contenant trois levures est piégée. Le graphique présente l’évolution de l’aire relative de la goutte au cours du temps selon que le microsysteme ait été saturé en eau ou non. L’évolution de l’aire relative du piège est aussi indiquée en rouge; (C) Pièges en puits. Quatre puits contenant chacun une goutte de 20pL sont illustrés dans l’insert. Le zoom présente le schéma d’une goutte dans un puits en dessous duquel passent les canaux d’un réservoir. Le graphique présente l’évolution du volume relatif d’une goutte au cours du temps [Shim et al., 2009].

Lorsque l’écoulement d’huile est arrêté, on observe aussi une diminution exponentielle du volume qui ne peut plus s’expliquer par des arguments de partition de l’eau dans l’huile. Il s’agit de l’évaporation de l’eau au travers du PDMS. Nous avons observé ce même phénomène lorsque nous avons piégés des gouttes dans des canaux circulaires (Fig. 2.15.b). Le piégeage des gouttes est dû à des effets purement capillaires. La goutte est totalement confinée dans le canal principal et se retrouve, tout en gardant un confinement vertical, sous une forme plus sphérique (forme de plus basse éner-

gie) dans le piège. Ainsi quand il n'y a plus d'écoulement dans le système, les gouttes restées dans les canaux vont migrer dans les pièges desquels elles ne bougeront qu'en cas d'application d'une surpression ou d'un écoulement [Schmitz et al., 2009].

Si le PDMS n'est pas saturé en eau préalablement, la goutte s'évapore très rapidement jusqu'à disparaître complètement au bout de 8-10h (Fig. 2.15.b, courbe bleue). Dans le cas où l'on place le PDMS un jour dans de l'eau pour le saturer, l'évaporation est temporairement retardée. On observe même un gonflement de la goutte (courbe verte). Le PDMS étant flexible, lorsque les écoulements sont arrêtés, il relaxe la pression emmagasinée et le piège rétrécit légèrement (courbe rouge) de sorte que la goutte est légèrement plus aplatie et apparaît plus large. Toutefois, cet effet n'est pas suffisant pour expliquer une telle augmentation de la taille de la goutte. Nous supposons qu'une partie de l'eau stockée dans le PDMS lors de sa saturation est restituée à la goutte qui contient du milieu de culture. La goutte finie tout de même par s'évaporer si l'expérience est poursuivie sur des temps plus longs. Ainsi, saturer le PDMS ne fait que retarder l'effet de l'évaporation.

Pour arrêter totalement l'évaporation, Shim et al. ont eu l'idée de placer un réservoir d'eau, séparé d'une membrane de PDMS de $5\mu\text{m}$, en dessous du réseau de pièges (Fig. 2.15.c). La géométrie du piège est légèrement différente que précédemment, avec un évasement en largeur et en hauteur mais le piégeage par effet capillaire est le même. Les auteurs ont utilisé ce réseau de gouttes pour déterminer simultanément l'expression génétique et l'activité enzymatique de cellules individuelles de *E. coli* [Shim et al., 2009]. Il faut signaler que le volume des gouttes n'est pas totalement constant et qu'il subit au bout de 20h environ 10% de variation. Il serait intéressant de voir les fluctuations de volume au cours du temps. En effet, il y a une compétition entre l'évaporation qui a lieu par le haut et les côtés du canal et la diffusion de l'eau du réservoir vers la goutte. Que ce passe-t-il si la goutte est très concentrée ? D'après l'hypothèse développée précédemment, les gouttes gonfleraient.

Nous avons vu que le PDMS était flexible et perméable à l'eau ce qui le rend un mauvais candidat pour le stockage long de gouttes d'eau. Ces problèmes peuvent être compensés par la technologie mais au prix d'une forte augmentation de la complexité. Le dernier système présenté nécessite tout un jeu de valves et plusieurs étages de PDMS. Nous montrerons dans le chapitre suivant qu'en passant dans le verre, on peut éviter tous les problèmes rencontrés dans le PDMS et garder un microsystème simple.

2.2.4 Stabilité des micro-gouttes

La coalescence est un processus irréversible qui déstabilise les émulsions et peut se terminer par une séparation de phase. La fusion des microbioréacteurs en change la composition et le volume, détruisant tout l'intérêt de la synthèse monodisperse. Lors de la préparation de notre échantillon, la coalescence peut se produire principalement à deux endroits où les gouttes rentrent en contact : lors de la compaction et lors du passage du microsystème de fabrication des gouttes à la chambre de stockage. La stabilisation des gouttes est donc une étape essentielle pour le suivi de cinétiques à l'intérieur des microbioréacteurs.

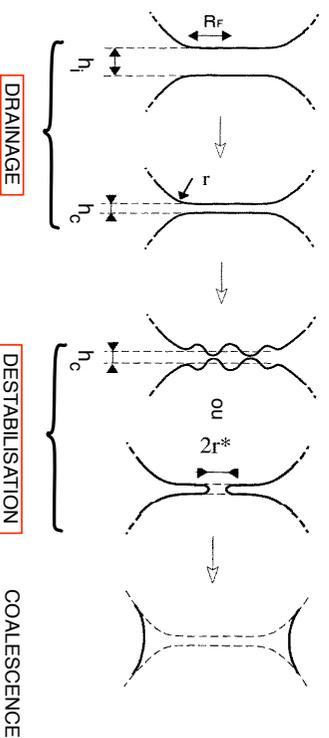


FIGURE 2.16 – Mécanisme de la coalescence. Les gouttes sont séparées initialement par un film d'épaisseur h_i qui se réduit par drainage jusqu'à une taille critique h_c . Des mécanismes de déstabilisation peuvent alors se mettre en place (mécaniques ou thermiques par nucléation de pores) et conduisent à la fusion des deux interfaces. Adapté de [Bibette et al., 1999].

On distingue habituellement deux étapes dans la coalescence : le drainage du film d'huile qui sépare les deux gouttes jusqu'à une épaisseur critique h_c à partir de laquelle la déstabilisation du film peut conduire à la fusion en une seule goutte [Bibette et al., 1999]. L'étape de drainage est principalement celle qui conditionne la coalescence dans les systèmes sous écoulement.

Pour stabiliser les microbioréacteurs nous utilisons des tensioactifs. Ils abaissent la tension de surface et permettent de prévenir la coalescence. Dans le cas d'émulsions inverses, *i.e.*, d'eau dans l'huile, les surfactants utilisés sont solubles dans l'huile (Loi de Brancroft). Ils sont composés d'une partie hydrophobe et d'une tête polaire. La courbure spontanée des molécules de surfactant peut changer la courbure de l'interface et empêcher les processus actifs thermiquement de nucléation de pores reliant les deux gouttes et qui conduisent à leur fusion. Les répulsions stériques entre les chaînes hydrophobes interviennent aussi pour s'opposer au rapprochement des interfaces [Cabane and Hénon, 2003].

Les molécules de surfactant ne restent pas piégées à l'interface mais s'échangent avec celles présentes dans la phase continue. La dynamique de peuplement de l'interface joue un rôle prépondérant

dans la coalescence [Baret et al., 2009b]. Ainsi, lorsque la goutte est déformée par des cisaillements dans les volumes morts de notre circuit, le drainage du film est accéléré et des régions de l'interface peuvent se retrouver déplétées en surfactant, ce qui peut conduire à la coalescence [Bremond et al., 2008]. Il est donc nécessaire de réduire les volumes morts et de travailler à des concentrations en surfactant suffisantes pour peupler à tout moment l'interface.

La coalescence peut avoir lieu dans la chambre. Si une goutte mouille le substrat, cela peut déstabiliser l'émulsion de sorte à engendrer une coalescence de masse. La chambre est donc traitée de manière à ce qu'un film d'huile isole les parois de la phase aqueuse. Enfin, la présence de défauts ou de particules dans la chambre peut aussi favoriser la déstabilisation de l'émulsion par coalescence ou fragmentation.

Remarque : La diminution de la tension de surface dû aux surfactant signifie qu'il est plus facile de créer de l'interface. Ainsi, là où les cisaillements sont importants dans le circuit, les gouttes peuvent aussi se rompre en gouttes plus petites, ce qui menace l'intégrité du réseau. Il faut donc choisir des surfactants qui confèrent à l'interface un module élastique élevé.

Nous venons de voir comment créer des microbioréacteurs qui contiennent un nombre défini de cellules, de manière contrôlée et reproductible. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'arrêt les gouttes en des réseaux 2D pour pouvoir réaliser des suivis cinétique à grande échelle sur chaque microbioréacteur. La stabilisation des émulsions est apparue alors comme une étape obligatoire pour conserver l'intégrité des microbioréacteurs sur la durée de la cinétique étudiée. L'encapsulation des cellules permet de suivre l'activité sécrétoire seulement si les produits demeurent à l'intérieur des gouttes. Nous nous intéressons donc dans la partie qui suit aux transferts qui peuvent se produire entre les microbioréacteurs.

2.3 Echanges entre les microbioréacteurs

Outre les phénomènes de coalescence évoqué précédemment, le réseau de gouttes est aussi le lieu privilégié d'échange de solutés par diffusion mais aussi de flux d'eau à travers la membrane d'huile qui sépare les différents microbioréacteurs.

2.3.1 Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement consiste en un transfert de matière entre les gouttes de phase dispersée au travers de la phase continue. Ce mécanisme est possible du fait de la solubilité à l'échelle moléculaire de la phase dispersée dans la phase continue.

Le mûrissement d'Ostwald se traduit par la diminution du diamètre de petites gouttes qui se vident dans les plus grosses jusqu'à leur disparition complète [Taylor, 1998]. Ce processus est une conséquence de la différence de pression de Laplace entre deux gouttes. P_L des gouttes de plus petit rayon étant supérieure, la matière va diffuser spontanément des plus petites gouttes vers les plus grosses.

Dans le cas de notre réseau, le rayon des gouttes est grand, $R \in [20 - 50\mu m]$ et $\gamma \in [1; 10mN.m^{-1}]$ de telle sorte que $P_L \sim 500Pa$. Cette valeur étant très faible et les gouttes étant monodisperses, on peut totalement négliger l'effet du mûrissement d'Ostwald dans notre système. Cette idée est renforcée par l'encapsulation d'espèces insolubles dans l'huile (sels, acides aminés, sucre présents dans le milieu de culture) qui empêche la diffusion de l'eau entre les gouttes, ce qui entraînerait une réduction de l'entropie de mélange [Aronson and Petko, 1993].

2.3.2 Mûrissement de composition

Le mûrissement de composition intervient dans le cas où il existe une différence de composition entre les gouttes de phase dispersée, les substances dispersées étant toutes légèrement solubles dans la phase continue. L'entropie de mélange favorise alors l'uniformisation des compositions par diffusion des espèces solubilisées dans les gouttes internes vers la phase continue externe et vice-versa [Kabalnov and Weers, 1996; Arlauskas and Weers, 1996].

2.3.3 Flux d'eau par gradient de pression osmotique

Lorsqu'au sein du réseau 2D, des gouttes possèdent une concentration en solutés différente, il se crée un transport qui vise à équilibrer le potentiel chimique des espèces dissoutes dans chaque

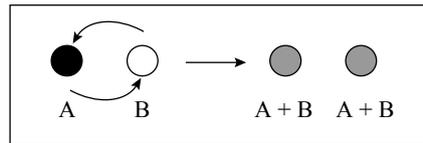


FIGURE 2.17 – Représentation du mûrissement de composition. Extrait de [Guery, 2006].

goutte. L'équilibre se produit par l'espèce qui est transportée la plus vite. Le film d'huile se comporte donc comme une membrane semi-perméable. L'expérience modèle présentée figure 2.18, illustre la fuite de l'eau vers le compartiment le plus concentré. Elle démontre aussi que c'est bien seulement l'eau qui fuit. En effet, si un autre composé diffusait de la goutte la plus concentrée vers la moins concentrée, alors cette dernière ne se viderait pas complètement. Les auteurs observent que la goutte d'eau ultra-pure a totalement disparu au bout de 8 minutes dans le cas où $E1$ et $E2$ sont en contact.

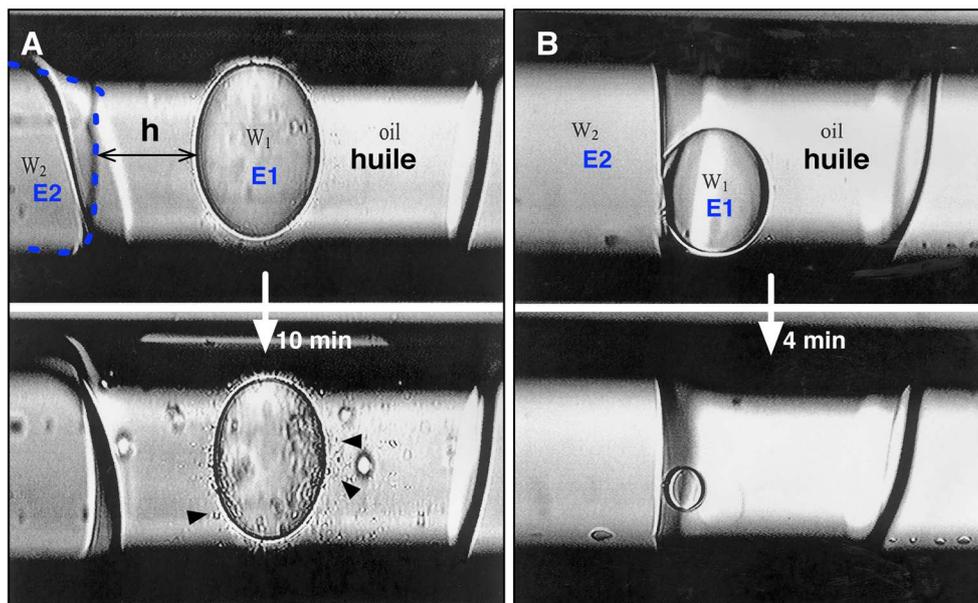


FIGURE 2.18 – Expérience dans un capillaire de diffusion de l'eau dans un modèle d'émulsion E/H [Wen and Papadopoulos, 2000]. Une goutte d'eau ultra-pure $E1$ est placée dans une phase huile, elle-même entourée d'eau $E2$ contenant $5M$ de $NaCl$. A) $E1$ est placée à une distance h de $E2$. $E1$ rétrécit au cours du temps. Il y a apparition des micro-gouttelettes (flèches) par auto-émulsification ; B) $E1$ est accolée à $E2$. $E1$ se vide rapidement dans $E2$.

Différents mécanismes permettent d'expliquer le transport de l'eau à travers l'huile. Même si dans la plupart des cas ces mécanismes ont lieu en même temps, l'expérience de Wen et al. permet de distinguer deux situations dans lesquelles l'un des mécanismes est dominant. Dans le cas où l'épaisseur de la membrane est faible (typiquement $h < 1\mu m$, comme dans un réseau compact), le mécanisme privilégié est l'hydratation de la partie hydrophile des tensioactifs qui diffusent alors de

la goutte la moins concentrée vers la plus concentrée. Si la membrane est assez fine des fluctuations peuvent conduire à une épaisseur de l'ordre d'une double couche de tensioactifs à travers laquelle les molécules d'eau diffusent librement (FIG. 2.18.b).

Lorsque les gouttes sont plus distantes, la vitesse de transport est plus lente. L'eau est transportée soit par hydratation des groupement polaire des tensioactifs ou par l'émulsification spontanée (gonflement de micelles) de petites gouttes d'eau qui diffusent vers l'interface huile/ phase aqueuse fortement salée (FIG. 2.18.a).

2.3.4 Mesure du transport entre les gouttes

Bai et al. ont mis au point un système microfluidique qui permet de mesurer le transport de molécules entre deux gouttes d'émulsion [Bai et al., 2010]. La création des paires se fait par l'arrêt des gouttes dans des pièges en U qui ne peuvent contenir que deux gouttes (FIG. 2.19.c). Les cinétiques à

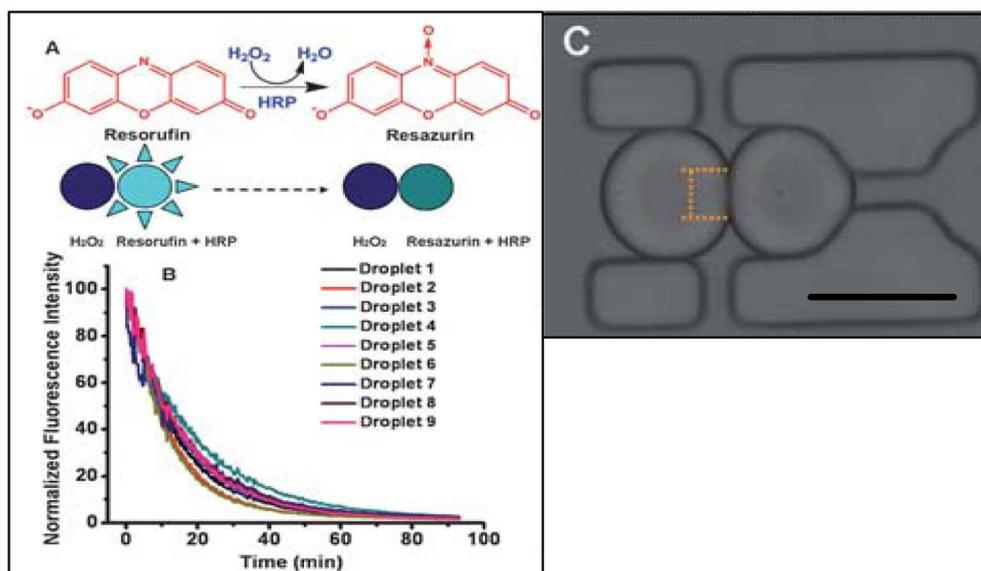


FIGURE 2.19 – Transport entre deux gouttes. (A) Schéma de la diffusion du peroxyde d'hydrogène et de l'oxydation de la resorufin par HRP. (B) Evolution de l'intensité de fluorescence de gouttes contenant 50mM de resorufin et 0.07 mg/mL de HRP. La goutte voisine contient 0.3M de H₂O₂. (C) Deux gouttes piégées avec des débits d'huile de 6000µL/hr. Les lignes oranges indiquent la longueur de l'interface entre les gouttes. L'échelle représente 60µm

l'intérieur des gouttes sont le plus souvent lues par des marqueurs fluorescents. Les auteurs ont montré qu'en fonction du surfactant utilisé pour la formulation des gouttes et de leur solubilité dans la phase continue, certaines espèces diffuseront plus ou moins rapidement. Ainsi, par exemple un fluorophore tel que la fluoresceine va diffuser entre les réservoirs dans une émulsion formulée avec du span80TM mais restera dans les gouttes formulées avec le surfactant Raindance EA.

Si les grosses molécules sont retenues dans les gouttes, nous avons vu que pour des arguments thermodynamiques, les molécules qui diffusent le plus vite doivent compenser tout écart de concentration entre les gouttes. Nous illustrons dans les figures 2.19.a et 2.19.b la diffusion de l'eau oxygénée (H_2O_2) entre deux gouttes formulée avec le surfactant Raindance EA. Deux gouttes de composition différentes sont mises en contact. Une goutte contient la resofurin, qui est fluorescente, et une enzyme, la *horseradish peroxidase* (HRP). L'autre goutte contient de l'eau oxygénée (FIG. 2.19). En présence de H_2O_2 , la HRP oxyde la resofurin en resazurin, qui n'est pas fluorescente. En suivant la décroissance du signal de fluorescence dans la goutte qui contient le fluorophore, les auteurs ont pu démontré la diffusion du H_2O_2 . Ils n'ont pas accès directement au temps de diffusion car le signal est une combinaison de la cinétique de transport entre les gouttes et de la cinétique enzymatique.

Nous proposerons dans le chapitre suivant, une méthode de mesure du transport qui n'est pas basée sur la fluorescence. De plus, dans l'expérience de Bai et al., la géométrie du contact entre les gouttes (distance entre les interfaces et longueur du contact) est imposée par les débits d'injection de la phase continue. Or nous avons vu (FIG. 2.15.a) que l'injection de phase continue favorisait l'évaporation de l'eau au dehors des gouttes, ce qui va biaiser l'évaluation des concentrations et la mesure des phénomènes de diffusion. Nous proposerons ainsi de fixer la géométrie des contacts en jouant sur la physico-chimie des émulsions.

2.4 Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre différentes stratégies qui permettent l'étude de processus cellulaires, de l'échelle de la cellule unique à la microcolonie. La microfluidique s'est imposée alors, de par les dimensions qu'elle met en jeu, comme une science adaptée à la fabrication et au développement des microbioréacteurs.

La réduction des dimensions à l'extrême par l'utilisation de la microfluidique digitale a permis de multiplexer les réactions à très grande échelle, donnant accès à des milliers de réactions en parallèle. Pour pouvoir suivre des cinétiques dans des gouttes, nous avons alors suggéré de passer par un format de réseau 2D.

Nous avons vu que la compartimentalisation des cellules permettait d'accéder à l'activité sécrétoire des cellules ou encore à la cinétique enzymatique. Toutefois, la qualité des mesures dans les émulsions est conditionnée par une maîtrise de la stabilité et du transport entre les gouttes. Nous allons voir dans le chapitre qui suit une méthode originale de mesure en parallèle de cinétiques associées à l'activité cellulaire. Celle-ci repose sur la mesure du transport entre les gouttes.

Dispositif expérimental

Il est hélas devenu évident aujourd'hui que
notre technologie a dépassé notre humanité.

(ALBERT EINSTEIN)

Pour remettre les choses dans leur contexte historique, le concept de lecture bi-dimensionnelle de gouttelettes d'émulsions est issu des travaux de thèse de Julien Sylvestre et a donné lieu à un brevet (WO/2010/007307). L'idée consiste à confiner une monocouche de gouttelettes entre deux lames et à réaliser un balayage pour effectuer une lecture de l'échantillon. Chaque goutte est considérée comme un microbioréacteur indépendant. La figure 3.1 présente un schéma du dispositif mis en oeuvre. Ce dispositif permet une analyse de l'échantillon à la fois en lumière blanche et en fluorescence sur une surface supérieure à 37cm^2 (correspondant à deux lames de microscope mises côte à côte). La taille de la surface analysée dépend du pas de temps choisi entre deux acquisitions. L'ensemble du dispositif est placé dans une enceinte thermostatée. Un programme écrit en LabviewTM assure la synchronisation des obturateurs, du déplacement de la platine motorisée et de l'acquisition des images par la caméra CCD. L'extraction et l'analyse des données (taille des gouttes, signal de fluorescence) est effectuée ensuite par un autre programme écrit en MatlabTM.

Nous avons vu que les réseaux 2D de gouttes d'émulsion permettaient de suivre la cinétique de processus biologiques sur un grand nombre d'échantillons. Les limitations rencontrées pour les cinétiques sur de longues durées sont l'évaporation de l'eau et le transport des solutés entre les gouttes.

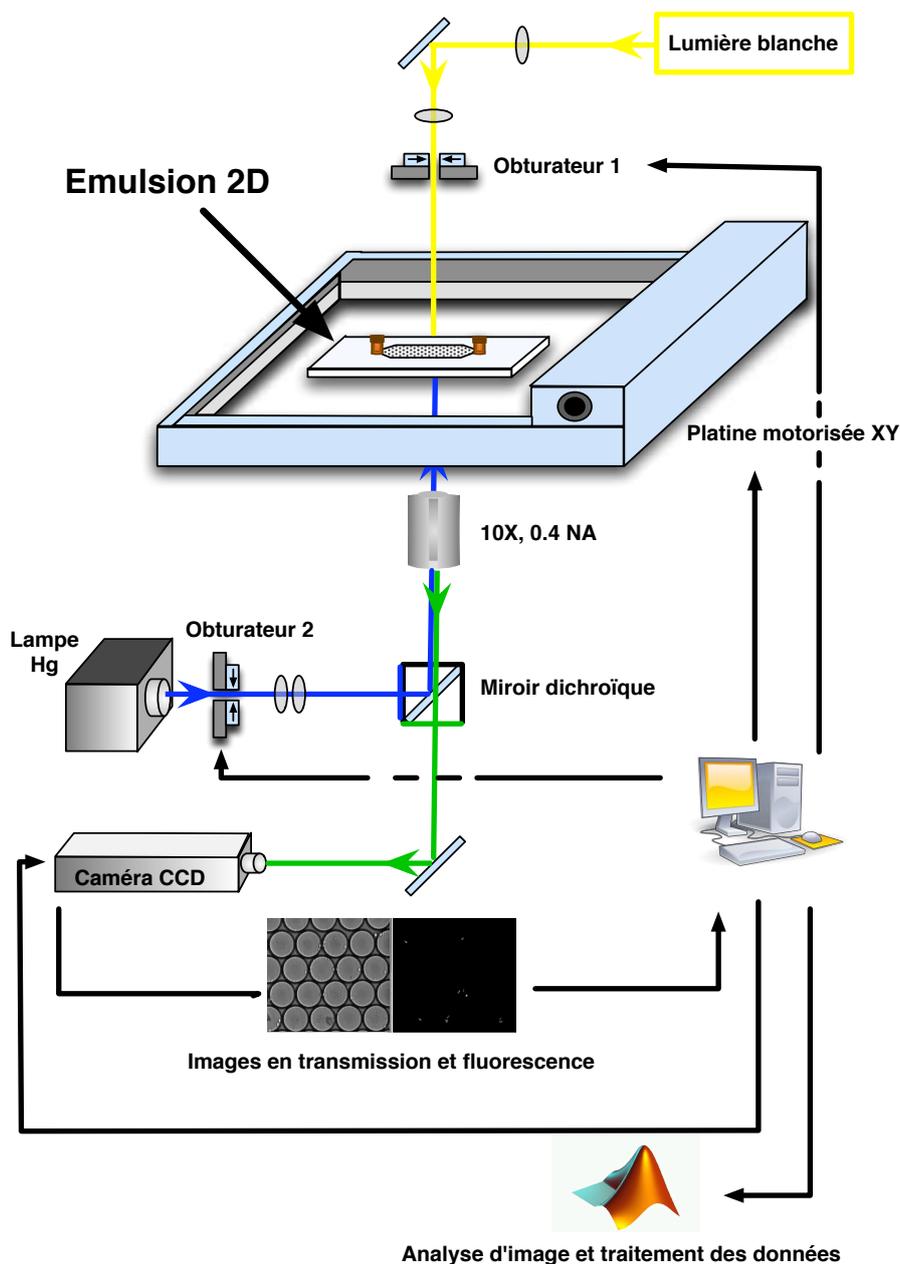


FIGURE 3.1 – Schéma du dispositif expérimental d'analyse d'émulsion à 2D.

Le but de ce chapitre est de présenter un nouveau système qui s'affranchit de ces problèmes. Nous aborderons les aspects techniques qui mènent à la fabrication d'un tel réseau : de la synthèse des microbioréacteurs à leur stockage en passant par les méthodes de mesure. Nous montrerons alors que le système que nous avons développé présente une nouvelle méthode originale qui permet de suivre l'évolution de la quantité d'espèces dissoutes dans les microbioréacteurs. Les potentiels chimiques sont gardés constants en travaillant avec un grand nombre de réservoirs vides de telle manière que les flux osmotiques dans le réseau reflète les activités biologiques de polymérisation ou dépolymérisation.

3.1 Stockage de gouttes dans une chambre en verre

Le verre est un matériau rigide (69GPa , comparé au PDMS : $\sim 2\text{MPa}$), transparent dans le visible et totalement hermétique. C'est donc un choix naturel pour le stockage et l'observation à long terme de gouttes d'émulsion. Toutefois, faire des microsystèmes en verre requiert des moyens et du savoir-faire qui en font un matériau peu utilisé dans la majorité des laboratoires de microfluidique. C'est pour cette raison que nous avons choisi de combiner la simplicité de prototypage du PDMS pour synthétiser les microbioréacteurs tout en gardant les propriétés du verre pour le stockage et l'observation au microscope (Fig. 3.2).

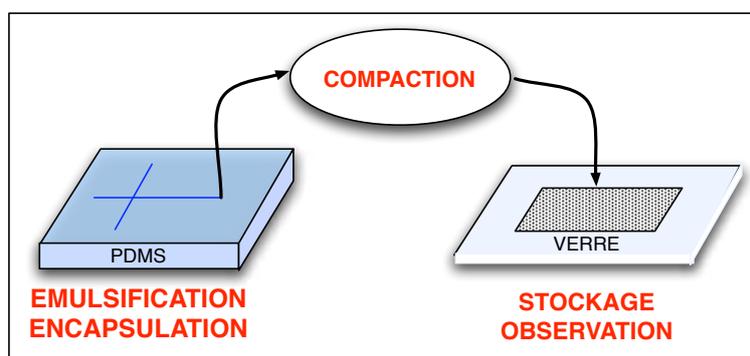


FIGURE 3.2 – Schéma principe de la préparation de l'échantillon.

Dans cette partie, nous présenterons les systèmes microfluidiques mis en oeuvre pour synthétiser les microbioréacteurs. Nous expliquerons ensuite la nécessité de compacter l'émulsion et les moyens mis en oeuvre pour y arriver.

3.1.1 Dispositifs microfluidiques

Le système en PDMS utilisé est décrit en figure 3.3, avec les dimensions correspondantes. Nous utilisons une géométrie de flow-focusing. Le flux de solution aqueuse contenant les cellules est focalisé par deux flux d'huile dans le rétrécissement typique des géométries de flow-focusing [Anna et al., 2003]. Le système est complètement fabriqué en PDMS selon les méthodes classiques décrites en Annexe A, ce qui résulte en des canaux fluorés d'une hauteur uniforme de $50\ \mu\text{m}$.

Nous avons utilisé principalement deux formulations : une minérale et une fluorée. Nous détaillerons la formulation minérale dans le chapitre suivant. La formulation fluorée est composée d'une huile perfluorée HFE-7500 (3M, St. Paul, Minnesota, USA) contenant 2.5% de surfactant "EA" (Raindance Technologies, Lexington, MA, USA) qui est un copolymère à block PEG-PFPE amphiphile (Holtze 2008).

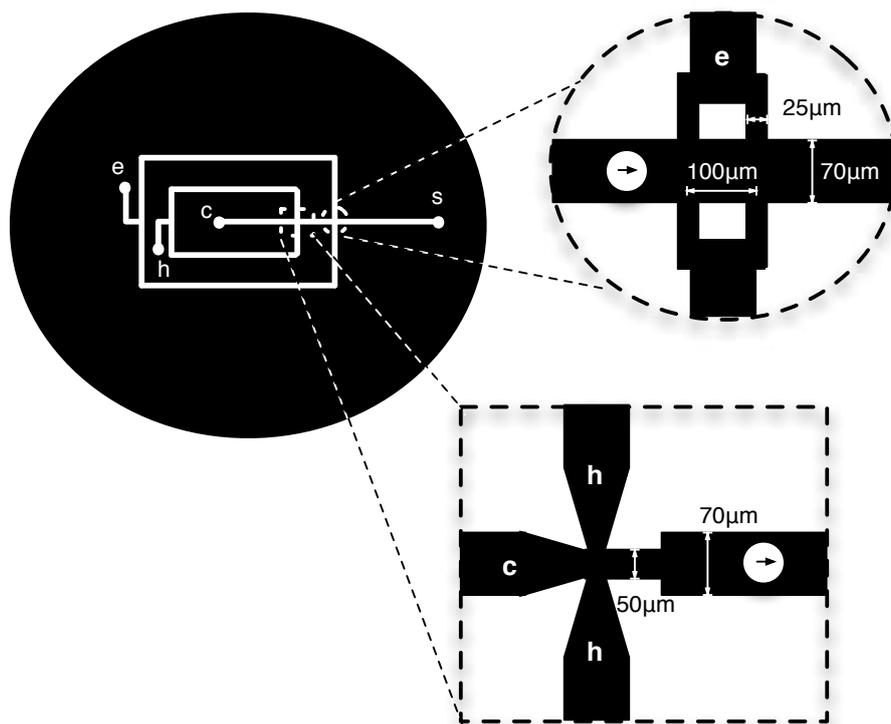


FIGURE 3.3 – Architecture du système utilisé pour l’encapsulation de cellules dans une émulsion monodisperse. A gauche : vue d’ensemble, "h" et "c" désignent les entrées d’huile et de cellules respectivement ; "e" et "s" désignent les sorties de l’extracteur et de collection de l’émulsion respectivement. A droite : extracteur d’huile, les canaux de vidange sont plus petit que le diamètre moyen d’une goutte. En bas : géométrie de flow focusing, la suspension de cellules est injectée par l’entrée centrale et focalisée par deux flux d’huile. En régime de dripping, pour un système de $50\mu\text{m}$ de profondeur, le diamètre moyen d’une goutte se situera entre $50\mu\text{m}$ (dimension de la constriction) et $70\mu\text{m}$ (dimension du canal). Le volume des gouttes que nous fabriquons sont typiquement situés entre 30pL et 200pL .

Les écoulements des fluides sont contrôlés en flux par des pousses-seringues. Les débits typiques sont de $800\mu\text{L}/\text{hr}$ pour l’huile fluorée et $300\mu\text{L}/\text{hr}$ pour l’huile minérale (~ 20 fois plus visqueuse). Le débit pour la suspension de cellules est de $100\mu\text{L}/\text{hr}$. Les cellules sont agitées par un barreau magnétique placé dans la seringue. Afin de réduire l’agrégation des cellules, celles-ci peuvent être légèrement soniquées. Nous avons observé que pour obtenir une distribution de cellules à l’intérieur des gouttes qui suit la loi de Poisson, il était préférable d’utiliser un tube en Téflon (FEP) de diamètre intérieur faible ($\sim 40\mu\text{m}$) pour connecter la seringue au système microfluidique. Cela peut s’expliquer, d’une part par les propriétés non adhésives du Téflon et d’autre part, par l’augmentation du cisaillement dans le tube qui va aider à fractionner les agrégats.

Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* sont mises en culture à 30°C dans du milieu synthétique défini (SD) complété en acides aminés et en sucre (voir Annexe C). Une préculture est réalisée jusqu’à atteindre le milieu de phase exponentielle ($2 < DO < 6$). Les cellules sont ensuite

diluées jusqu'à une concentration telle qu'après encapsulation il y ait en moyenne 1 cellule toute les 10 gouttes.

Une fois les gouttes produites, elle sont stockées dans une chambre en verre. La chambre en verre consiste en deux lames de 1mm d'épaisseur séparées par un fil d'épaisseur connue (de $25\mu\text{m}$ à $40\mu\text{m}$). Une des lames possède deux ports pour l'entrée et la sortie de la chambre. Les ports sont percés dans le verre par abrasion à l'aide d'une sableuse (Model HP-1, Texas Airsonics). Les deux lames sont

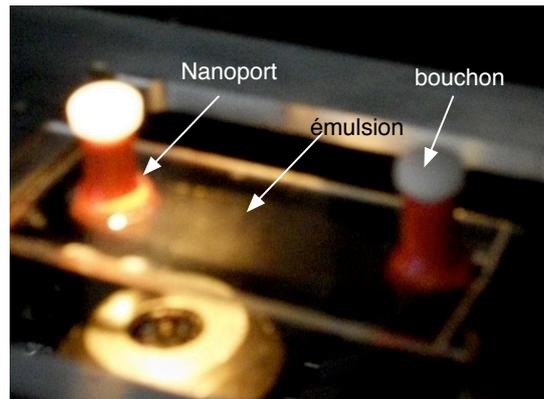


FIGURE 3.4 – Image de chambre en verre contenant une émulsion placée sur la platine XY. Les connecteurs sont bouchés pour l'incubation.

collées par une colle photorécurable NO81TM (Norland Optical). Les connectiques consistent en deux plots NanoportTM (Upchurch Scientific) placés sur les trous préalablement percés dans la lame supérieure. La figure 3.4 présente une illustration d'une chambre de $25\mu\text{m}$ de profondeur. Une fois la chambre remplie de l'émulsion monodisperse, les plots sont bouchés pour la phase d'incubation et d'observation.

Pour suivre les cinétiques se produisant à l'échelle des gouttes, il faut que celles-ci ne se déplacent pas de plus d'un diamètre de goutte entre chaque acquisition. Si le déplacement est plus important, alors nous perdons la localisation des microbioréacteurs et il nous est impossible de reconstruire la séquence temporelle. Il est donc nécessaire d'arrêter les gouttes.

3.1.2 Arrêt des gouttes

Quelque soit la qualité de la fabrication de la chambre en verre, il existe toujours un défaut de planéité tel qu'une goutte libre placée dans la chambre va subir l'effet de la gravité. La seule force qui va s'opposer au déplacement est la force visqueuse. Ainsi, en écrivant l'équilibre des forces, on

obtient la vitesse de déplacement d'une goutte isolée et non confinée, *i.e.*, sans glissement à la surface,

$$\vec{U} = \frac{2}{9} \frac{a^2 \Delta \rho \vec{g}}{\eta} \quad (3.1)$$

a est le rayon de la goutte (de l'ordre de $25\mu m$) ; $\Delta \rho$ est la différence de densité entre l'eau et l'huile (dans le cas de l'huile fluorée $\sim 600 kg.m^{-3}$) ; η est la viscosité de la phase continue soit $0.6.10^{-3} Pa.s$. On peut alors estimer $U \sim 1 mm.s^{-1}$. Les gouttes d'émulsion vont se déplacer dans le sens inverse de la gravité, on dit qu'elles "crément". Afin de réduire cette vitesse, l'idée consiste à augmenter la dissipation visqueuse en confinant la goutte entre les deux parois de la chambre (Fig. 3.5). La modélisation de l'hydrodynamique du phénomène n'est pas simple mais on peut essayer avec des ordres de grandeurs d'obtenir la vitesse de déplacement de la goutte. Si l'on considère le modèle de Bretherton [Bretherton, 1961], la force de friction, liée à l'épaisseur du film qui sépare les gouttes de la paroi de la chambre s'exprime comme : $F_{fr} \propto \gamma Ca^{2/3}$, Ca étant le nombre capillaire associé à la goutte se déplaçant à la vitesse \vec{U} . En écrivant l'équilibre des forces et en projetant, on obtient U :

$$U = \frac{\gamma}{\mu} \left(\frac{\Delta \rho \sin \theta a H}{\gamma} \right)^{3/2} \quad (3.2)$$

γ est la tension de surface $\sim 5.10^{-3} N/m$; μ la viscosité cinématique $10^{-3} Pa.s$; $\sin \theta \sim \theta \sim 10^{-3} rad$; H l'épaisseur de la chambre $25\mu m$; On trouve alors $U \sim 3.10^{-2} \mu m/s$ soit un déplacement de $2\mu m$ toutes les 10 minutes.

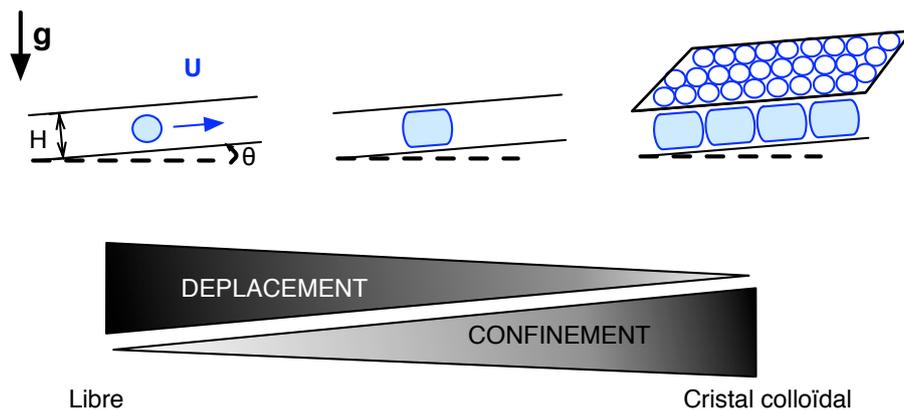


FIGURE 3.5 – Illustration du déplacement des gouttes et du confinement.

Cette estimation est légèrement sous évaluée car expérimentalement on observe un déplacement plus important qui parfois est supérieur au diamètre d'une goutte sur le temps entre deux acquisitions. Ce qu'il faut retenir de cette relation, ce sont les dépendances de la vitesse des gouttes avec la différence de densité $\Delta \rho$ des deux phases, le rayon de la goutte a et l'inverse de la viscosité de la phase

continue $\frac{1}{\mu_c}$.

Afin de s'affranchir totalement du déplacement des gouttes nous avons augmenté le degré de confinement jusqu'à obtenir un verre colloïdal 2D. On peut expliquer l'arrêt des gouttes de la manière imagée suivante : les gouttes se comportent comme les atomes d'un verre qui ne peuvent se réarranger du fait des partenaires qui les entourent. On parle encore en science colloïdale de "jamming" [Cates et al., 1998]. Seul un mouvement d'ensemble est possible mais il est d'autant plus ralenti que l'échantillon est grand (la force de friction étant alors proportionnelle au nombre de gouttes). Dans cette configuration, les gouttes sont confinées à 3D.

3.1.3 Compaction de l'émulsion

Nous proposons deux méthodes qui permettent de réaliser un réseau 2D compact de gouttes d'émulsion. La première méthode est basée sur l'équation 3.1. Des gouttes libres d'eau dans une huile fluorée vont crêmer rapidement et se compacter naturellement en strates de plus en plus denses [Mueth et al., 1996]. L'émulsion de microbioréacteurs est collectée dans une seringue puis réinjectée par strate dans la chambre de stockage. Le choix de la strate permet le choix de la fraction volumique en gouttes.

La figure 3.6, illustre les différents états de compaction que l'on peut obtenir. Les gouttes étant déformables, on peut aller au-delà du "close-packing", $\Phi^{3D} = 0.7405$ calculé par Ostwald qui correspond à $\Phi^{2D} = 0,9069$ pour des gouttes cylindriques, c'est-à-dire compactées à 2D comme dans notre chambre [Princen, 1983]. Les gouttes prennent une forme hexagonale typique des films de savon (Fig. 3.6.a). Ce n'est pas le cas idéal pour arrêter les gouttes car celles-ci vont avoir tendance à relaxer pour retrouver une forme circulaire, ce qui va se traduire par des mouvements d'ensemble du réseau. La relaxation est possible car l'organisation très compacte des gouttes se fait par domaine et pas sur l'ensemble de la chambre. Dans le cas "close-packed", les gouttes se touchent sans déformation de l'interface. Il est difficile de sélectionner cette strate de la précédente. Ainsi est-il préférable de travailler dans un cas légèrement moins compacte. Le réseau de goutte est assez dense pour limiter les mouvements et la présence de défauts va permettre "d'absorber" des déformations du réseau dû par exemple à des événements de coalescence.

Une autre méthode de compaction consiste à extraire de l'huile à mesure que l'émulsion est formée. L'extracteur de phase continue décrit figure 3.7 est basé sur une analogie entre électrocinétique et hydrodynamique [Schindler and Ajdari, 2008]. Dans le cas d'un liquide newtonien incompressible et d'un écoulement laminaire dans un canal, il existe une correspondance univoque entre la perte de

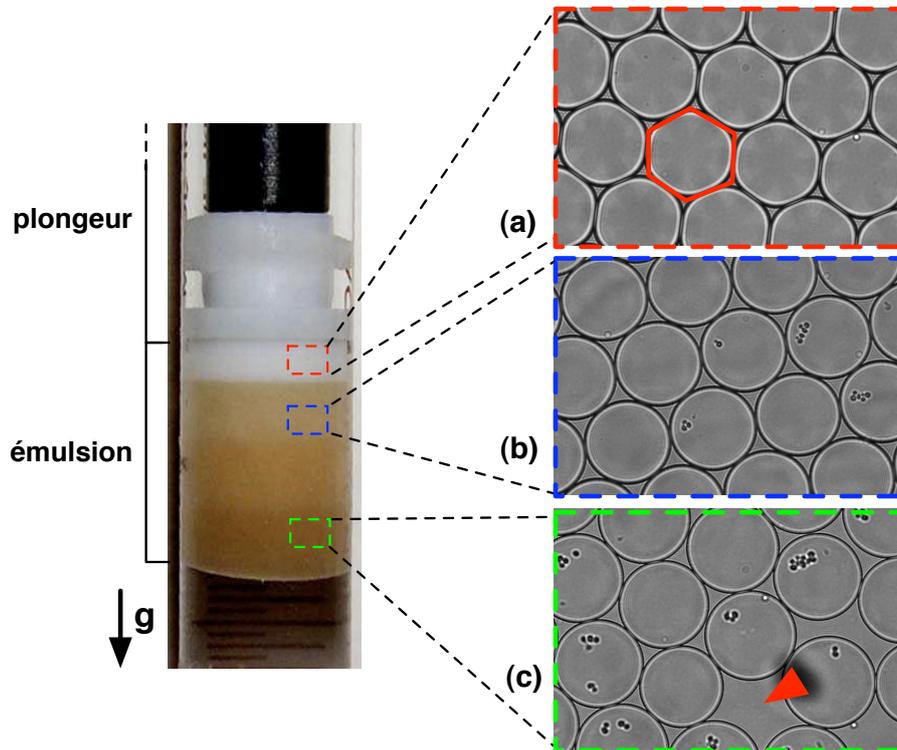


FIGURE 3.6 – Création d'un réseau 2D de gouttes par réinjection d'émulsion stratifiée. Dans une seringue des émulsions contenant des concentrations croissantes en colorant ont été collectées en série. On observe une stratification des fractions d'émulsion sans mélange entre les différentes concentrations. (a) Strate la plus compacte $0.9069 \leq \Phi^{2D} < 1$, les gouttes sont déformées ; (b) Strate compacte, les gouttes sont au "close-packing", $\Phi^{2D} \sim 0.9069$; (c) Strate semi-compacte $\Phi^{2D} < 0.9$, il y a des défauts (flèche rouge) qui peuvent permettre aux gouttes de se réarranger. *Les images ne correspondent pas aux strates indiquées sur la seringue à gauche, il s'agit d'une illustration.*

charge ΔP et le débit de liquide Q .

$$\Delta P = RQ \quad (3.3)$$

Cette loi de Hagen-Poiseuille est formellement similaire à la loi d'Ohm qui donne un coefficient de proportionnalité entre le courant et la tension au borne d'une résistance électrique. Par analogie, on appelle R , la résistance hydrodynamique du canal, qui dépend de la viscosité du liquide et des dimensions du canal. Un extracteur de phase continue est donc l'équivalent d'un diviseur de courant et on pourra appliquer la loi de noeuds pour estimer les débits dans les différentes branches du circuit. Toutefois, dans le cas bi-phasique, la résistance hydrodynamique dans un canal est augmentée par la présence des gouttes, il faudra donc en prendre compte dans les calculs [Sessoms et al., 2009].

Si la goutte est plus petite que les dimensions du canal, elle suit les lignes de champs imposée par le flux de la phase continue et sera entraînée dans le sens du débit le plus élevé [Chan and Leal, 1979]. Tan et al. ont utilisé ce principe pour réaliser la séparation de gouttes satellites (générés lors de la formation de l'émulsion) de gouttes monodisperses d'une émulsion [Tan and Lee, 2005]. De

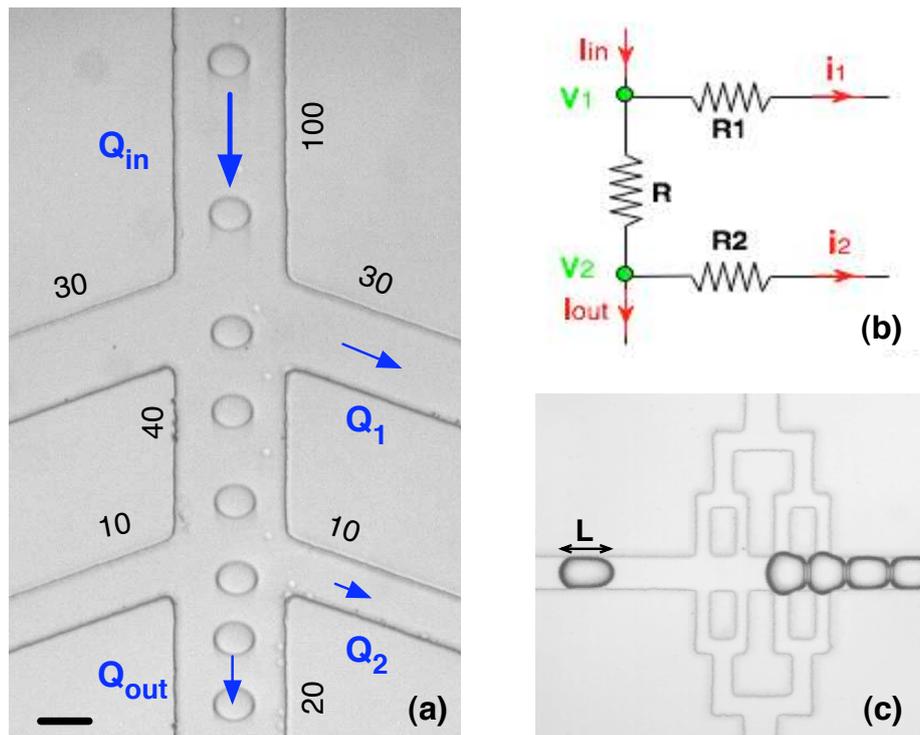


FIGURE 3.7 – Extracteur de phase continue. (a) Cas où les gouttes n’occupent pas tout le canal. Les gouttes sont compactées à mesure que de l’huile est extraite dans les canaux latéraux. Les débits sont contrôlés par un pousse-seringue à l’entrée et un connecté aux canaux d’extraction. La symétrie de la géométrie permet de garder les gouttes au centre du canal. Les nombres le long des canaux représentent la fraction du débit total d’huile Q_{in} . L’échelle correspond à $25\mu\text{m}$; (b) Analogie électrique. Du fait de la symétrie nous ne représentons qu’un demi-circuit. Pour obtenir les débits en (a), nous avons calculé $R_2 = 3R_1$. De plus il faut $R \ll (R_1, R_2)$; (c) Cas où les gouttes occupent tout le canal. Le contrôle de l’extraction est réalisé en adaptant de manière manuelle la résistance des canaux d’extraction.

la même manière, nous nous arrangeons donc pour que les débits dans les branches latérales soit inférieurs à celui dans le canal principal. Pour cela il suffit soit de contrôler le débit dans les branches latérales avec un pousse seringue soit d’imposer les résistances hydrodynamiques géométriquement par les dimensions des canaux latéraux.

Dans le cas où la goutte occupe tout le canal, la résistance imposée par la goutte est bien plus importante et dépend de la longueur de la goutte, L [Vanapalli et al., 2009]. Afin d’éviter qu’elle ne se fractionne dans les canaux latéraux, ceux-ci sont réduits à une taille au moins inférieure à celle du canal. Avec cette méthode de compaction jusqu’à 92% de l’huile utilisée pour la fabrication des gouttes peut être extraite soit une fraction volumique maximale dans la chambre $\Phi^{2D}=0.92$ [Frenz et al., 2009].

Nous venons de voir comment fabriquer un réseau de gouttes bi-dimensionnel plus ou moins compacte de microbioréacteurs dans une chambre en verre. Pour pouvoir suivre la cinétique d’évé-

nements qui se produisent à l'intérieur de ces compartiments nous avons réduit le mouvement des gouttes. Nous allons aborder maintenant les méthodes de mesure des réservoirs et de leur contenu.

3.2 Mesures

Les mesures sont réalisées à l'aide d'une caméra CCD megapixel (ORCA-R11, Hamamatsu) équipée d'une barrette photosensible de 1344×1024 pixels, dont un pixel mesure $6.45 \mu\text{m}$ et possédant un bruit d'électrons faible ($8e^-$). Avec un objectif adéquat, nous pouvons ainsi réaliser l'acquisition d'une centaine de gouttes en même temps avec une bonne sensibilité.

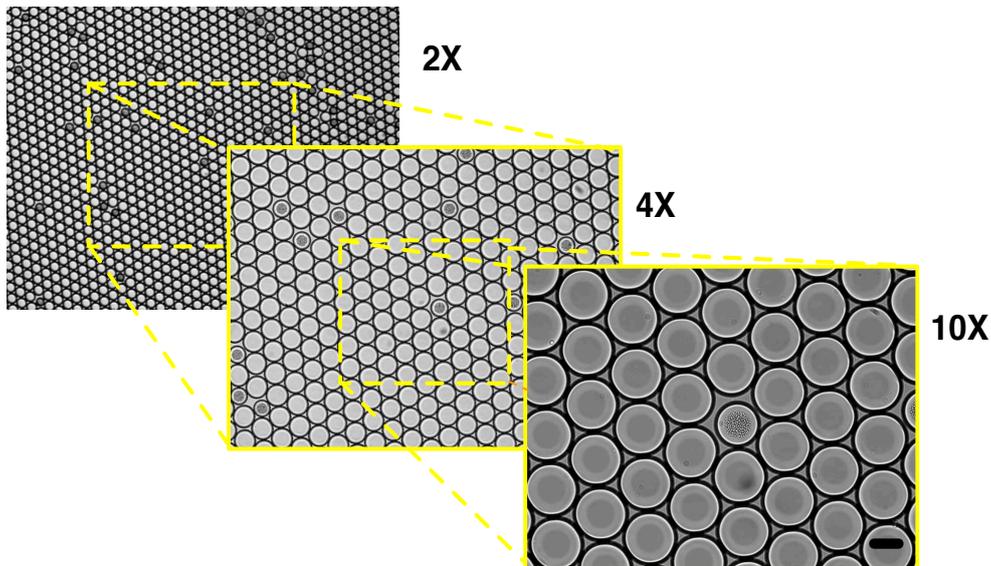


FIGURE 3.8 – Observation du réseau de gouttes à plusieurs grossissements. L'échelle représente $50 \mu\text{m}$.

Nous présentons deux méthodes de mesure. L'une est basée sur la fluorescence des cellules ou d'un substrat, l'autre repose sur une analyse de l'image acquise en lumière blanche (Fig. 3.8 et donne accès à la taille des gouttes. Nous nous attarderons sur les principales sources d'erreur et leur correction.

3.2.1 Mesure de la biomasse

Pour pouvoir suivre la croissance des cellules, il faut avoir accès à la quantité de cellules dans la gouttes au cours du temps. Nous avons vu précédemment qu'une manière de mesurer la biomasse était de compter les cellules ou encore de mesurer la densité optique. Dans notre système, il n'est pas possible de mesurer la densité optique et le comptage des cellules reste approximatif du fait de la croissance de la colonie dans les trois dimensions. Nous avons donc utilisé la microscopie de fluorescence.

Nous utilisons une souche dont le cytosquelette d'actine a été marqué par un rapporteur fluorescence *mcitrine* qui absorbe à 516nm et émet dans le jaune à 529nm [Shaner et al., 2005]. Cette

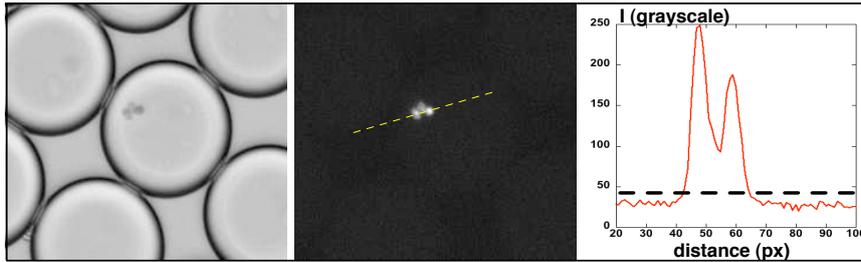


FIGURE 3.9 – Mesure de l'intensité d'une colonie poussant à l'intérieur d'une goutte. De gauche à droite : image en transmission de la microcolonie à l'intérieur de la goutte. Image de fluorescence. On réalise une section de deux cellules. Intensité de fluorescence le long de la section.

construction ACT1-*mcitrine* a été démontrée comme un bon marqueur de la taille des cellules [Talia et al., 2007].

La figure 3.9 illustre une acquisition en lumière fluorescente. Les cellules sont éclairées durant 500ms à chaque acquisition (toutes les 10 minutes). L'intensité de l'illumination est réduite afin d'éviter la phototoxicité tout en gardant un rapport signal/bruit suffisant pour détecter les cellules. Nous déterminons manuellement une valeur seuil (ligne en pointillés noirs) au dessus de laquelle on considère que la lumière vient des cellules. En effet, on observe une légère autofluorescence du milieu de culture due aux résidus tryptophan des protéines dissoutes. Cette autofluorescence disparaît au cours du temps par photoblanchiment. L'aire sous la courbe est intégrée et constitue un signal de fluorescence qui est proportionnel à la biomasse de la colonie [Talia et al., 2007].

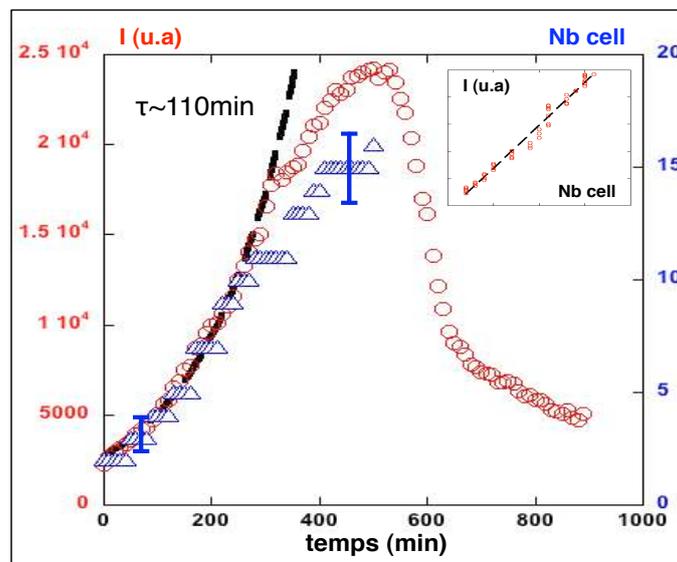


FIGURE 3.10 – Mesure de l'intensité d'une colonie à l'intérieur d'une goutte et du nombre de cellules au cours du temps. (\circ) : intensité de fluorescence, la courbe en pointillés représente un ajustement exponentiel selon l'équation 1.3); (Δ) : nombre de cellules dans la goutte ; l'insert correspond à la relation entre l'intensité de fluorescence et le nombre de cellules (seulement sur la phase exponentielle).

On vérifie la linéarité entre le signal de fluorescence et la biomasse en comptant manuellement les cellules à l'intérieur des gouttes (Fig. 3.10). Cela constitue une tâche difficile et peu précise car les cellules poussent dans les trois dimensions et il est compliqué de définir quand il a eu division ou non. L'erreur sur l'évaluation du nombre est d'autant plus grande que le nombre de cellules dans la goutte est élevé. On observe que la croissance des cellules est bien exponentielle avec un temps de division identique à celui de culture de *S. cerevisiae* en batch. La décroissance du signal fluorescent dans la phase stationnaire est due au photoblanchiment du rapporteur qui n'est plus renouvelé quand les cellules arrêtent de se diviser.

Afin d'évaluer l'erreur de mesure, on détermine la réponse impulsionnelle (PSF) de notre système optique (objectif et caméra) en réalisant l'image en fluorescence d'une bille de $3.1\mu\text{m}$ à différentes focalisations en z (Fig. 3.11). Pour éviter les mouvements de la bille, la lame est préalablement recouverte de poly(L-lysine). L'objectif utilisé dans toutes nos expériences est un Apofluor 10X avec une ouverture numérique de 0.4 .

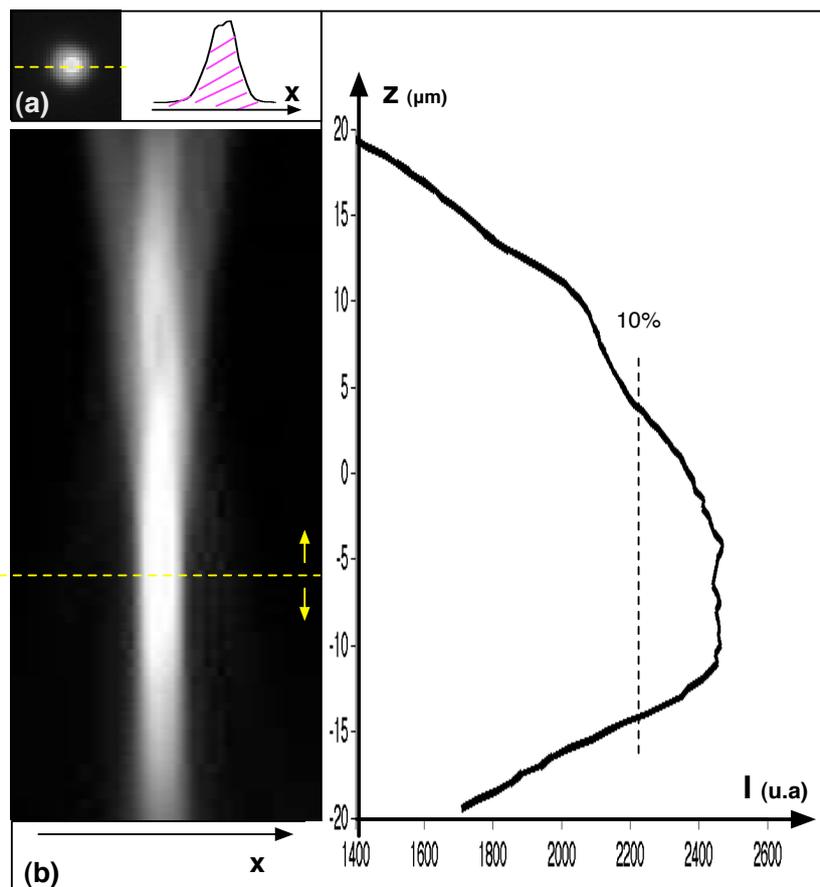


FIGURE 3.11 – Point Spread Function de notre système optique pour une bille de $3.1\mu\text{m}$. (a) Image de la bille en fluorescence. On réalise une section le long de l'axe des x ; (b) On trace alors la PSF, c'est-à-dire le signal pour chaque section en fonction de la position verticale en z . Pour chaque position on intègre le signal de fluorescence que l'on représente dans le graphique. Le zéro est arbitraire.

La bille est immobilisée sur la lame du dessous, ce qui peut expliquer la dissymétrie de la PSF. L'intégration du signal d'une section en x pour différentes focalisations nous indique l'intensité de fluorescence en fonction de z (FIG. 3.11, courbe à droite). On détermine alors que l'erreur que l'on peut commettre si le système de stockage n'est pas plan est inférieure à 10% si l'on reste dans une zone de $\sim 20\mu\text{m}$ autour de la position où le signal est le plus intense, *i.e.*, focalisé sur l'objet à étudier.

Nous venons de voir que la fluorescence est un moyen fiable d'accéder à la taille et donc à la biomasse des cellules dans la goutte, ce qui est légèrement différent du nombre de cellules dans la mesure où une cellule peut être plus ou moins grosse selon son âge et la position dans le cycle cellulaire où elle se trouve [Lord and Wheals, 1981]. Aussi, cette méthode ne nous donne pas accès à la valeur absolue de la biomasse mais seulement à son évolution. En effet, il nous faudrait calibrer l'intensité de fluorescence avec la masse sèche des cellules.

3.2.2 Mesure du volume des gouttes

Le volume des gouttes est un paramètre très important de notre expérience. Il est suivi au cours du temps par des images en transmission des gouttes. L'image est binarisée afin que les zones non éclairées apparaissent noires et les zones éclairées blanches. On distingue alors les gouttes par un contour noir. L'aire à l'intérieur de ce contour est mesurée. On en déduit un rayon R (FIG. 3.12.b). On calcule alors le volume selon la formule suivante dont la démonstration est donnée en Annexe C :

$$V = 2\pi r(R-r)^2 + \pi^2 r^2 \left[R - r \left(1 - \frac{4}{3\pi} \right) \right] \quad (3.4)$$

où $r = \frac{h}{2}$ est le rayon de courbure de la goutte aplatie. L'équation 3.4 n'est valable que si $R \geq r$. L'erreur relative que l'on commet sur le volume dépend de la taille de la goutte. Plus la goutte est petite plus l'erreur sera importante 3.12.c. On trouve une erreur maximale (lorsque $R = r$) de $\sim 2\%$. La goutte est éclairée par des rayons parallèles qui par le jeu des réflexions et réfractions à l'interface eau/huile n'arrivent pas tous au détecteur (FIG. 3.12.a). Le rayon que l'on mesure est donc différent du rayon réel tel que $R_{\text{real}} = 0.93R$ [Bongiovanni et al., 2000]. On estime l'erreur absolue commise sur le volume $\frac{V_{\text{real}} - V}{V_{\text{real}}} \sim 16\%$.

L'image 3.12 illustre la mesure du rayon des gouttes. On peut déterminer expérimentalement l'erreur que l'on fait si la chambre n'est pas plane en mesurant le volume des gouttes en fonction de la position en z . On mesure alors une erreur sur le rayon de un demi micron par micron de défocalisation, ce qui est négligeable pour les gouttes que nous mesurons ($R \sim 50\mu$).

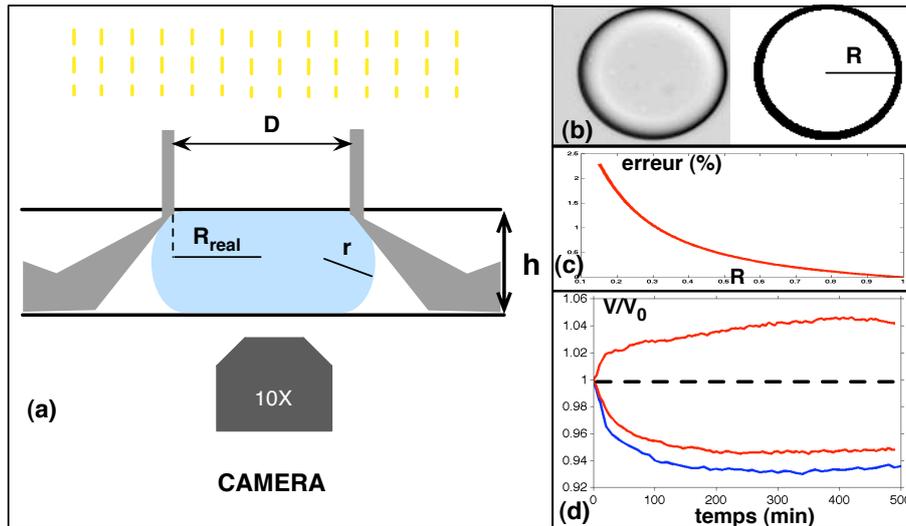


FIGURE 3.12 – Mesure du rayon des gouttes. (a) La chambre est illuminée par une lumière parallèle. Les rayons sont réfléchis lorsqu’ils traversent une interface de telle sorte que certains ne parviennent pas jusqu’à la caméra. On observe alors des zones sombres. (b) Images en transmission (droite) et binarisée (gauche) d’une goutte. (c) Erreur relative commise sur la mesure du volume en fonction de la taille du rayon. (d) La relaxation de système se traduit par une variation du volume qui s’atténue au bout de 200min. En rouge pour la formulation fluorée. En bleu pour la formulation adhésive.

Enfin, une autre source d’erreur sur la mesure du volume existe dans le système. Nous avons observé que la chambre relaxait au cours du temps (FIG. 3.12.d). En effet, les fortes pressions imposées pour la préparation du réseau déforment la chambre au niveau des joints en époxy. De plus, l’émulsion concentrée possède un caractère viscoélastique [Princen, 1983; Bécu and Manneville, 2005], ce qui engendre une relaxation du système qui peut prendre jusqu’à 200 minutes. Cet effet est facilement compensé en mesurant le volume d’une goutte vide du réseau c’est-à-dire dont le volume doit rester constant tout au long de l’expérience. On corrige alors l’erreur de relaxation en divisant le volume de la goutte d’intérêt par le volume normalisé de cette goutte référence.

Nous avons vu les méthodes de mesures utilisées dans notre système. Nous allons maintenant nous consacrer à la variation de volume associée au transport de solvant entre les microbioréacteurs.

3.3 Mûrissement des gouttes du réseau

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il existait des mécanismes d'échange entre les gouttes d'une émulsion. La vitesse et l'intensité de ces échanges dépend de la surface de contact entre les réservoirs et du moteur à l'origine du transport. C'est pourquoi dans un premier temps, nous présentons la mise en oeuvre d'une nouvelle formulation dont les propriétés permettent d'accélérer les échanges entre les gouttes du réseau. Nous validerons cette démarche par la mesure des paramètres du transport. Enfin, le moteur du mûrissement de composition des émulsions est la différence de potentiels chimiques entre les réservoirs. Ainsi, nous avons développé une nouvelle méthode de mesure qui repose sur le concept suivant : à potentiels chimiques constants, la variation de solutés dissous dans un microbioréacteur se traduit par un flux de solvant que nous pouvons mesurer au travers de l'évolution du volume des gouttes.

3.3.1 Emulsions adhésives

Dans certaines conditions de solvation, les monocouches de molécules de surfactant adsorbées à la surface de gouttes d'émulsion peuvent former une bicouche dans la zone de contact entre les gouttes. On dit alors que l'émulsion est adhésive. Un tel état est atteint en mélangeant deux huiles différentes, une dans laquelle le surfactant est soluble et l'autre dans laquelle le surfactant est insoluble et que l'on appelle : mauvais solvant [Poulin and Bibette, 1998]. L'adhésion varie fortement en fonction de la composition du mélange.

L'énergie d'adhésion est donnée par la relation de Young-Dupré :

$$\epsilon = 2\gamma(1 - \cos\theta) \quad (3.5)$$

qui relie l'énergie d'adhésion ϵ à l'angle de contact θ formé par les gouttes en contact. On s'aperçoit que l'énergie d'adhésion augmente avec la quantité de mauvais solvant (Fig. 3.13), ce qui se traduit par un étalement des gouttes dans la zone de contact, *i.e.*, une augmentation de la surface de contact (d'échange).

Pour une composition fixée, la surface du patch d'adhésion est fixée de même que la distance entre les gouttes. En effet, Poulin et al. ont mesuré par diffusion de neutron, l'épaisseur de la bicouche dans le cas d'une émulsion adhésive de dodécane dans l'eau contenant du SDS. Ils ont pu montrer que cette épaisseur de 29 Å ne dépendait pas de l'énergie d'adhésion [Poulin et al., 1996]. Ainsi la géométrie de la zone de diffusion est fixée par la taille des gouttes et la quantité de mauvais solvant qui

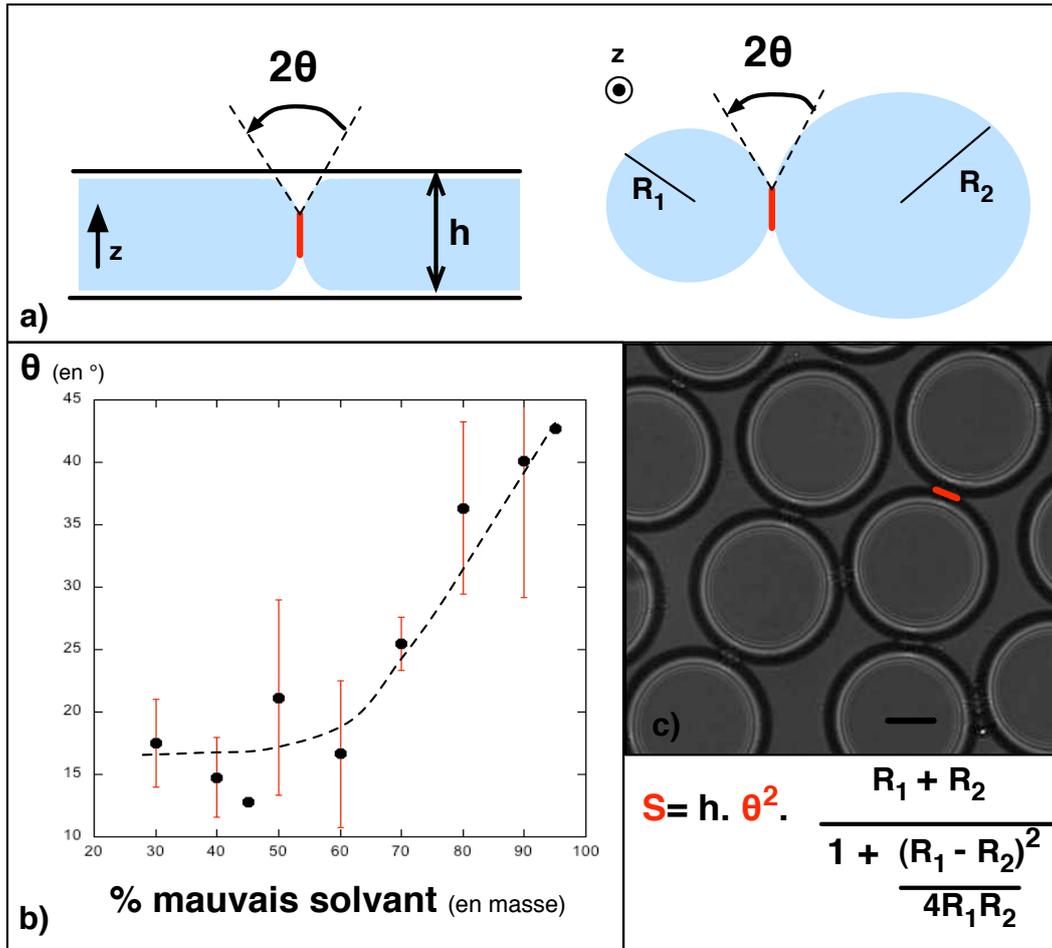


FIGURE 3.13 – Adhésion de gouttes d'émulsion dans une chambre en verre. (a) Schéma indiquant la géométrie du système en coupe longitudinale (à gauche) et en coupe transversale (à droite); (b) Evolution de l'angle de contact θ en fonction de la quantité de mauvais solvant. En pointillé, l'allure de la courbe; (c) Observation vue du dessous d'une émulsion adhésive que nous avons formulé. En rouge est surligné la zone de contact ou "patch" d'adhésion. L'échelle représente $25\mu\text{m}$. La formule nous indique la dépendance quadratique de la surface du patch avec l'angle de contact.

sont des paramètres que nous contrôlons ou pouvons mesurer au cours de l'expérience. Aussi peut-on imaginer que le transport sera plus rapide dans le cas des émulsions adhésives que non-adhésives.

La morphologie des bicouches de surfactant s'apparente fortement à celle des membranes biologiques composées d'autres molécules amphiphiles, les phospholipides dans lesquelles différents mécanismes de transport ont été proposés : l'inversion des molécules de tensioactif, c'est-à-dire leur passage d'une couche à l'autre ou encore par nucléation de trou à travers la membrane [Exerowa et al., 1992]. Quelque soit le mécanisme, le modèle phénoménologique est en accord avec la loi de Fick, comme nous allons le voir maintenant pour la mesure de la perméabilité dans notre système.

Remarque : Nous utilisons comme mauvais solvant un alkane semi-fluoré, c'est-à-dire dont une partie des hydrogènes a été remplacé par des atomes de fluor. Il en résulte que la densité de l'additif est supérieure à la densité de l'eau ($\rho_{\text{additif}} \sim 1380 \text{kg.m}^3$). Le bon solvant est une huile minérale 20 fois plus visqueuse que l'eau. Le mélange avec le surfactant sorbitan oléate (span80TM) permet de réaliser une émulsion peu adhésive comme illustré figure 3.13.c. et dont l'énergie d'adhésion varie peu pour des quantités de mauvais solvant compris entre 30 et 50% (figure 3.13.b). On peut donc choisir dans cette fourchette la bonne composition de la phase continue telle que la densité du mélange s'approche de celle de la phase dispersée. Ainsi, d'après l'équation 3.2, la vitesse de gouttes sera nulle dans la chambre. Le fait que la viscosité soit plus grande que celle de l'eau et la création d'un gel par l'adhésion entre-elles de toutes les gouttes du réseau renforce cet effet de telle sorte que la compaction en verre colloïdal n'est plus nécessaire.

Nous appellerons cette nouvelle formulation minérale : la formulation adhésive. Les gouttes formées dans la formulation adhésive sont plus fragiles que celle formées dans la formulation fluorée. Elles ont donc été manipulées de telle sorte à éviter un maximum le cisaillement.

3.3.2 Mesure du transport

Selon la formulation utilisée les protocoles diffèrent légèrement. L'idée principale étant de suivre l'évolution d'une goutte dont la concentration en solutés diffère de celle de ses voisines. Le soluté choisi pour ces mesures de transport est le glucose.

- Formulation fluorée : nous créons un réseau compact de gouttes. Pour cela, nous collectons dans une seringue une première fraction de gouttes contenant une forte concentration en glucose puis une deuxième fraction (10 fois moins) avec une concentration moins élevée et qui contient quelques particules fluorescentes (qui n'affectent pas la pression osmotique) afin de pouvoir identifier les réservoirs. Les gouttes sont mélangées puis réinjectées dans la chambre en verre en un réseau compact de gouttes de telle sorte qu'une goutte faiblement concentrée soit entourée de 6 gouttes plus concentrées.
- Formulation adhésive : les gouttes étant plus fragiles, il n'est pas possible de collecter deux fractions de gouttes sans qu'elles ne coalescent. Mais les gouttes étant adhésives, il n'est pas nécessaire de les compacter pour étudier le transport. Nous réalisons un circuit microfluidique qui combine deux géométries de flow focusing. Nous pouvons synthétiser alors en même temps les deux populations de gouttes qui sont recueillis directement dans la chambre. Dès qu'elles se rencontrent les gouttes adhèrent les unes aux autres. En diluant assez, on peut

obtenir des paires de gouttes, l'une fortement concentrée et l'autre plus faiblement.

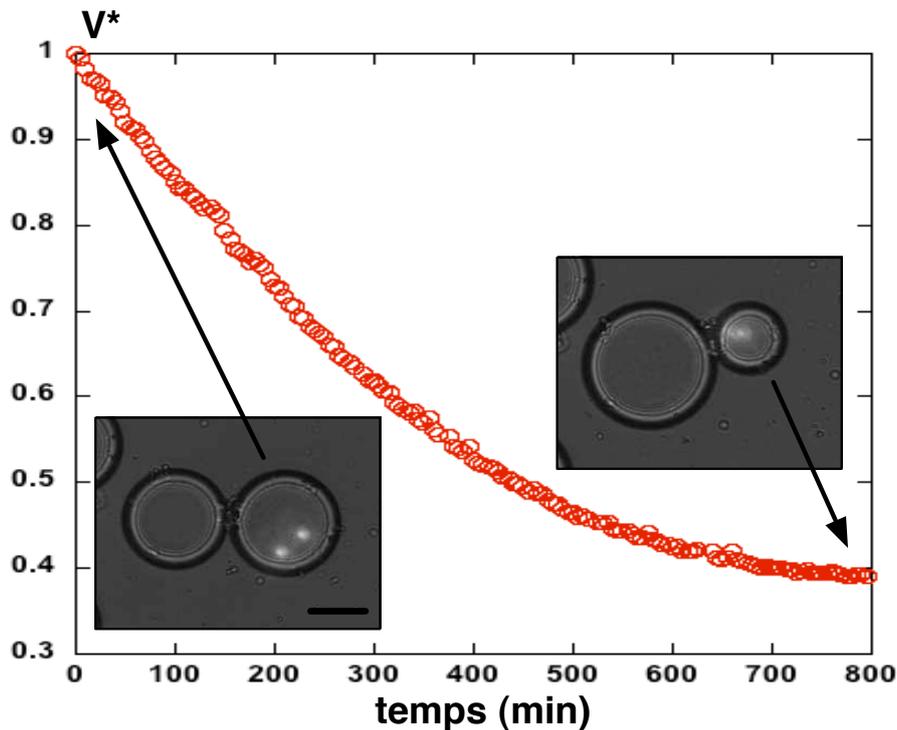


FIGURE 3.14 – Mesure du transport dans la cas d’émulsions adhésives. L’expérience est réalisée à 30°C dans une chambre de 25 μ m d’épaisseur. La goutte contenant les billes fluorescente contient 5g/L de glucose et l’autre 20g/L. Au bout de 800 minutes les volumes n’évoluent plus, la goutte avec les billes s’est vidée de plus de 70% de son volume. L’échelle correspond à 25 μ m.

Nous suivons la cinétique de fuite de l’eau du compartiment diluée, identifié par une bille fluorescente, vers le compartiment concentré (Fig. 3.14).

3.3.2.1 Modèle de perméation

La modélisation présentée dans cette partie est le résultat des travaux de Master 2 Recherche de Denis Cottinet [Cottinet, 2010].

Quelque soit le processus microscopique de transport à travers la bicouche de surfactant dans l’émulsion adhésive ou à travers la membrane d’huile dans l’émulsion non-adhésive, on peut le modéliser par un modèle de solubilité-diffusion au travers d’une membrane homogène d’épaisseur d_c et caractérisé par un coefficient de diffusion macroscopique D (Fig 3.15). Les échanges ont lieu à travers une surface S , k étant le coefficient de partage de l’eau dans l’huile.

Nous ne prenons en compte dans ce modèle que le transport de l’eau, le glucose étant une molécule beaucoup plus grosse, insoluble dans l’huile, elle ne diffusera que négligeablement. Nous le confirmerons expérimentalement. Le flux est dû à un écart de potentiels chimiques entre les compar-

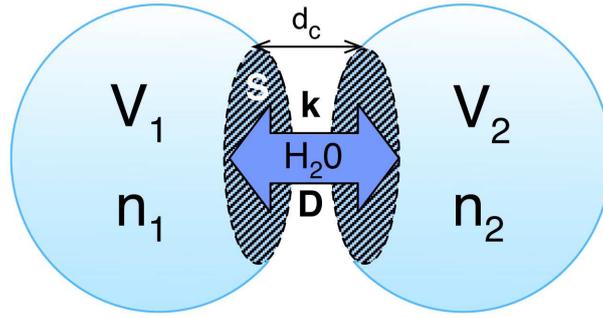


FIGURE 3.15 – Schéma du modèle de diffusion-solubilité. $n_1 \neq n_2$, un flux d'eau à travers la membrane d'épaisseur d_c s'établit pour équilibrer les concentrations.

timents. Le potentiel chimique de l'eau dans le compartiment i s'écrit : $\mu_i = \mu^0 + RT \ln(1 - x_i)$ où x_i est la fraction molaire de glucose dans le compartiment i . Le flux de molécules d'eau du réservoir 1 vers le réservoir 2, $j_{1 \rightarrow 2}$, s'exprime comme le produit de la force de transport, du coefficient de diffusion et du coefficient de partage de l'eau dans l'huile (solubilité). La force de transport est définie comme le gradient du potentiel chimique normalisé par l'énergie thermique (RT).

$$j_{1 \rightarrow 2} = -D.k.\nabla \frac{\mu}{RT}$$

en considérant $x_i \ll 1$ (nous travaillons typiquement à 100g/L de glucose, soit $x \sim 0,01$),

$$j_{1 \rightarrow 2} = \frac{D.k}{d_c} (\ln(1 - x_1) - \ln(1 - x_2)) \approx \frac{D.k}{d_c} (x_2 - x_1)$$

En introduisant le volume molaire de l'eau, v_e , on déduit la variation du volume V_1 :

$$\frac{\partial V_1}{\partial t} = v_e \frac{S.D.k}{d_c} (x_2 - x_1) = \mathbf{F}(x_2 - x_1) \quad (3.6)$$

\mathbf{F} est le flux volumique maximal permis. On retrouve une équation similaire à celle utilisée pour l'étude de la perméabilité des bicouches lipidiques : $\frac{1}{S} \frac{\partial V}{\partial t} = v_e \mathbf{P} \Delta c$ où $\mathbf{P} = \frac{D.k}{d_c}$ [Olbrich et al., 2000].

Dans le cas où l'un des réservoirs ne possède pas de glucose (par exemple $n_2 = 0$), l'équation 3.6 peut se simplifier et on peut trouver une solution analytique en $V_1^2 = f(t)$ [Thiam, 2010]. Ce n'est pas le cas dans notre expérience, où la solution est non linéaire, et peut s'écrire sous la forme $t = f(V_1, V_1^2, \ln(V_1 - V_1^{eq}))$.

3.3.2.2 Caractérisation

Nous déterminons la réponse impulsionnelle du système à un Δc imposé pour les formulations fluorée et minérale. En ajustant les données expérimentales au modèle de diffusion par une méthode des

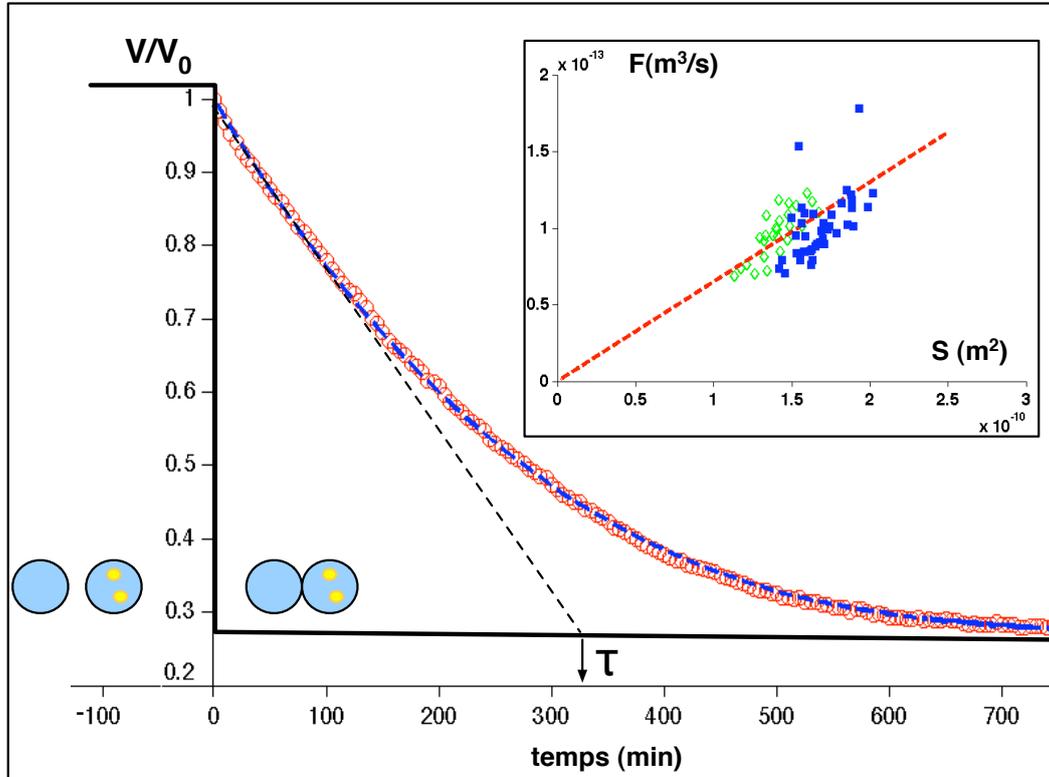


FIGURE 3.16 – Mesure du flux volumique F dans la cas d'une paire adhésive dans une chambre de $25\mu m$ d'épaisseur pour des gouttes de $\sim 70pL$. Les gouttes contiennent initialement $5g/L$ et $20g/L$ de glucose. Evolution du volume de la goutte la moins concentrée (au cours du temps) (\circ). La courbe bleue en pointillé est un ajustement avec le modèle et permet de déterminer F . En prenant la pente à l'origine on peut estimer le temps caractéristique τ de réponse du système. L'insert donne le flux volumique F (en $m^3 \cdot min^{-1}$) en fonction de la surface du patch S (en m^2) pour deux expériences différentes : (\blacksquare) :60 et $12.5g/L$; (\blacklozenge) : 20 et $5g/L$.

moindres carrés, nous évaluons les flux volumiques. La figure 3.16 présente le cas de la formulation adhésive. On trouve une relation linéaire entre F et S : $F = PS$ avec P , la perméabilité de la bicouche. $P \sim 10^{-5} m \cdot s^{-1}$ est inférieure à la perméabilité des bicouches de phospholipides, $3 \cdot 10^{-5} < P_{phos} < 2 \cdot 10^{-4} m \cdot s^{-1}$, et dépend principalement du type de phospholipide ainsi que de l'angle de contact entre les gouttes [Thiam, 2010].

La surface de contact est légèrement modifiée à mesure que la goutte la plus concentrée gonfle et que l'autre rétrécit. Toutefois, la mesure de la surface de contact au cours du temps nous indique que S varie moins de 10% tout au long du processus de transport à travers la bicouche. Pour une formulation donnée (θ fixé) on peut considérer que le flux volumique F est une constante. On extrait

le flux volumique maximal \mathbf{F} des courbes de relaxation. On trouve alors que le transport est plus rapide dans le cas de la formulation adhésive qu'avec la formulation fluorée. On a pour un contact entre deux gouttes : $\mathbf{F}_{\text{fluo}} \sim 14pL.\text{min}^{-1} \sim \frac{\mathbf{F}_{\text{adh}}}{3}$.

Lorsque les deux réservoirs aux concentrations différentes sont mis en contact, l'eau diffuse pour équilibrer les pressions osmotiques. On peut écrire l'équilibre ($\pi_1 = \pi_2$) :

$$\frac{RT}{v_e} \cdot \frac{x_1^0 V_1^0}{V_1^{eq}} = \frac{RT}{v_e} \cdot \frac{x_2^0 V_2^0}{V_2^{eq}}$$

Si l'on se place dans la limite où le réservoir 2 est très grand devant le réservoir 1, on déduit la relation suivante :

$$V_1^{eq} = \frac{x_1^0}{x_2} \cdot V_1^0 \quad (3.7)$$

qui relie le volume du réservoir 1 à l'équilibre à x_1 qui, lui-même, décrit le contenu de la goutte. Si l'équilibre est atteint assez rapidement, on obtient un état quasi-stationnaire dans lequel $V_1(t) \propto x_1(t)$, le suivi du volume permet de mesurer la variation de la quantité de solutés dissous dans la goutte.

L'équation 3.7 nous permet également de valider l'hypothèse selon laquelle seulement l'eau diffuse. En effet, on trouve que dans le cas d'une paire adhésive avec des concentrations initiales de 5 et 20g/L (FIG. 3.16), le volume à l'équilibre (final) de la goutte la moins concentrée doit valoir 0,25 fois le volume initial. La valeur expérimentale est légèrement supérieure et peut s'expliquer par le fait que l'équation 3.7 considère le volume de la goutte la plus concentrée infini. En utilisant l'expression exacte on retrouve bien la valeur expérimentale.

Remarque : En travaillant toujours dans le cas où l'un des réservoirs est infini (réservoir 2), on peut simplifier l'équation 3.6,

$$\frac{\partial V_1^*}{\partial t} = -\mathbf{F} \cdot \frac{x_2}{V_1^0} \left(\frac{V_1^{*eq}}{V_1^*} - 1 \right) \quad (3.8)$$

V_1^* est le volume normalisé. On peut ainsi mettre en évidence le temps caractéristique du système :

$$\tau = \frac{V_1^0}{\mathbf{F} \cdot x_2} \quad (3.9)$$

Le transport est plus rapide lorsque la concentration dans le réservoir infini augmente. Cette influence reflète le rôle de la force de transport qui est proportionnelle à la différence de concentration entre les réservoirs. De plus, l'équation 3.9 illustre que la quantité d'eau qui doit diffuser à travers l'interface

d'échange pour obtenir une variation donnée de concentration dépend du volume initial. Pour diluer ou concentrer un petit compartiment il faut ajouter/retirer moins de solvant. Pour de petits volumes on atteint donc plus rapidement l'équilibre.

3.3.3 Mesure de l'activité biologique

Maintenant que nous avons caractérisé notre système, nous proposons au travers d'un exemple de valider le concept de mesure d'une activité biologique par le mûrissement des microbioréacteurs. Nous nous plaçons dans la limite où le nombre de microbioréacteurs (compartiments d'intérêt) est faible devant les autres compartiments (sans activité biologique) qui jouent alors le rôle de réservoirs de pression osmotique.

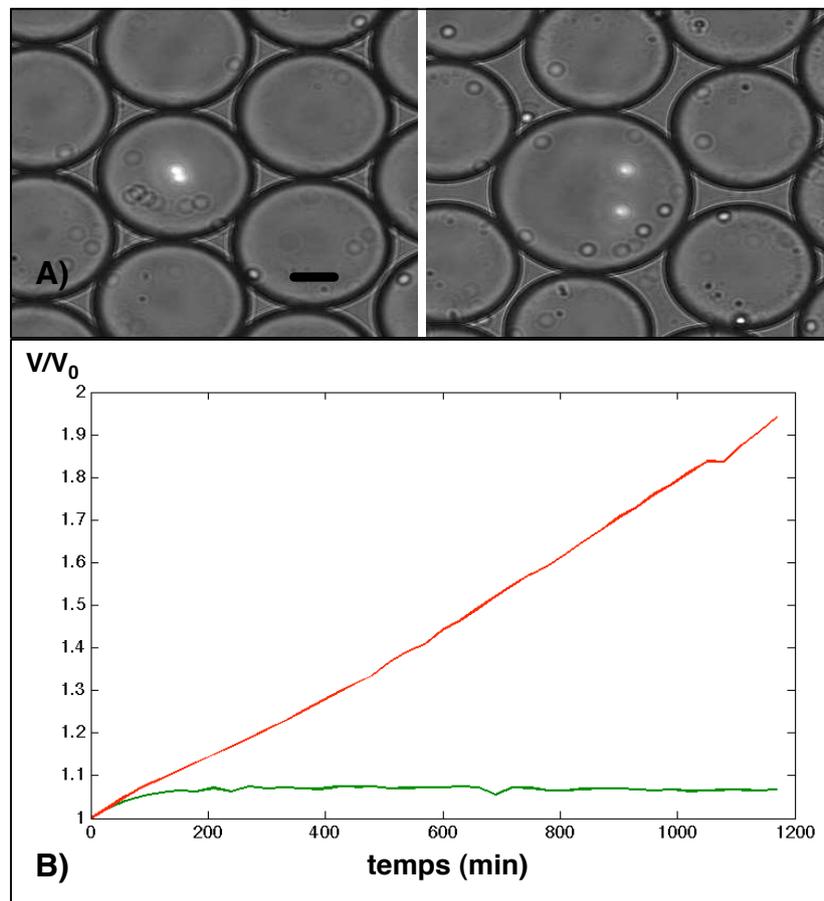


FIGURE 3.17 – Variation de volume associée à une réaction de protéolyse Les gouttes sont réalisées dans la formulation fluorée et stockées dans une chambre de $25\mu\text{m}$ de profondeur. (A) Des gouttes contenant 0.2mM de BSA et $1.4\mu\text{M}$ de protéase K dans un tampon Tris à 6mM (identifiées par des billes fluorescentes) sont entourées par un excès de gouttes ne contenant pas l'enzyme. Au bout de 20h, les gouttes dans lesquelles il y a eu une réaction ont gonflé. L'échelle représente $25\mu\text{m}$. (B) Evolution des volumes au cours du temps ; en rouge, une goutte réactive ; en vert, une goutte vide, réservoir de pression osmotique.

Nous avons choisi d'étudier la protéolyse, c'est-à-dire la réaction de dépolymérisation de protéines en peptides voire en acides aminés. L'exemple illustré par la figure 3.17 est celui de la lyse de l'albumine de sérum de bovin (BSA) par la protéase K. Cette expérience confirme l'équilibre osmotique entre les différents réservoirs. Le nombre d'objets en solution augmente dans les réservoirs contenant l'enzyme, tandis que la BSA reste intacte dans les réservoirs voisins. Cela se traduit par le gonflement des gouttes actives qui contiennent l'enzyme. La variation du volume des microbioréacteurs au cours du temps traduit bien l'activité biologique qui s'y déroule.

Pour avoir une réelle mesure des paramètres cinétiques de la réaction, il faut que le transport entre les gouttes soit suffisamment rapide. Ce n'est pas le cas dans cet exemple. Nous avons vu par l'équation 3.9 qu'il est possible d'accélérer le transport en jouant soit sur les propriétés physico-chimiques du système (flux volumique), sur la taille ou sur les concentrations mises en jeu. De la suite de ce manuscrit nous avons optimisé ces paramètres afin de suivre la consommation du glucose par la levure *S. cerevisiae*.

3.4 Conclusion

Nous avons mis au point un réseau bi-dimensionnel de gouttes d'émulsions. Nous avons dû figer les microbioréacteurs dans une chambre de stockage afin de pouvoir réaliser des mesures de cinétique sur un grand nombre d'échantillons.

D'un point de vue thermodynamique, l'ensemble des gouttes à l'intérieur de notre réseau peut être considéré comme un système fermé car il n'y a aucun échange avec l'extérieur. Mais à l'échelle, d'une goutte/microréacteur, celui-ci peut-être considéré comme ouvert puisqu'il échange de la matière avec les compartiments voisins. Cet échange permet de conserver un potentiel chimique constant. A partir de cette propriété nous avons développé une méthode de mesure de l'activité biologique à l'intérieur des microbioréacteurs.

Afin de s'assurer que les transferts entre les réservoirs étaient suffisamment rapides pour pouvoir suivre des cinétiques, nous avons mis au point une formulation qui permet de contrôler les propriétés de l'interface et de transport entre les réservoirs. Ainsi, nous proposons d'utiliser ce nouveau type de microbioréacteur pour étudier le métabolisme de *S. cerevisiae*.

CHAPITRE 4

Mesure du métabolisme de *S. cerevisiae*

Il faut manger pour vivre et non pas vivre pour manger.

(MOLIÈRE, *L'Avare*, Acte III, Scène V)

Nous venons de voir que l'utilisation de gouttes comme microbioréacteurs pouvait s'avérer un atout pour le suivi cinétique de réactions biologiques. En diluant le nombre de gouttes réactives, les potentiels chimiques sont imposés par la concentration des espèces dans les réservoirs vides. La lecture de la cinétique du nombre d'espèces actives osmotiquement dans les microbioréacteurs est alors rendue possible par la simple mesure de la variation du volume des gouttes. Nous avons configuré notre système afin que les transports soient optimisés, et que nous puissions assurer le suivi d'un grand nombre d'événements.

Dans ce chapitre nous appliquons cette nouvelle méthode de lecture à haut débit à la mesure du métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*. Nous démontrerons que nous pouvons accéder à la mesure d'un paramètre physiologique difficilement mesurable par les méthodes traditionnelles : l'énergie de maintenance. Nous nous interrogerons enfin sur la possibilité de séparer les souches selon leur capacité à métaboliser le glucose.

4.1 Observations phénoménologiques

Dans cette première partie nous allons décrire l'évolution de microbioréacteurs lorsqu'ils contiennent la levure *S. cerevisiae*. Cela va nous permettre de finir de caractériser notre système et surtout de mettre en exergue le potentiel de notre technique pour la détection de variations de comportements au sein de populations de levures.

4.1.1 Conservation de la masse

Des cellules de *S. cerevisiae* sont isolées dans des gouttes à l'intérieur d'un réseau bi-dimensionnel, comme décrit dans le chapitre précédent. La figure 4.1 montre l'évolution du volume des gouttes au cours du temps. La goutte contenant des levures rétrécit jusqu'à perdre 40% de son volume ini-

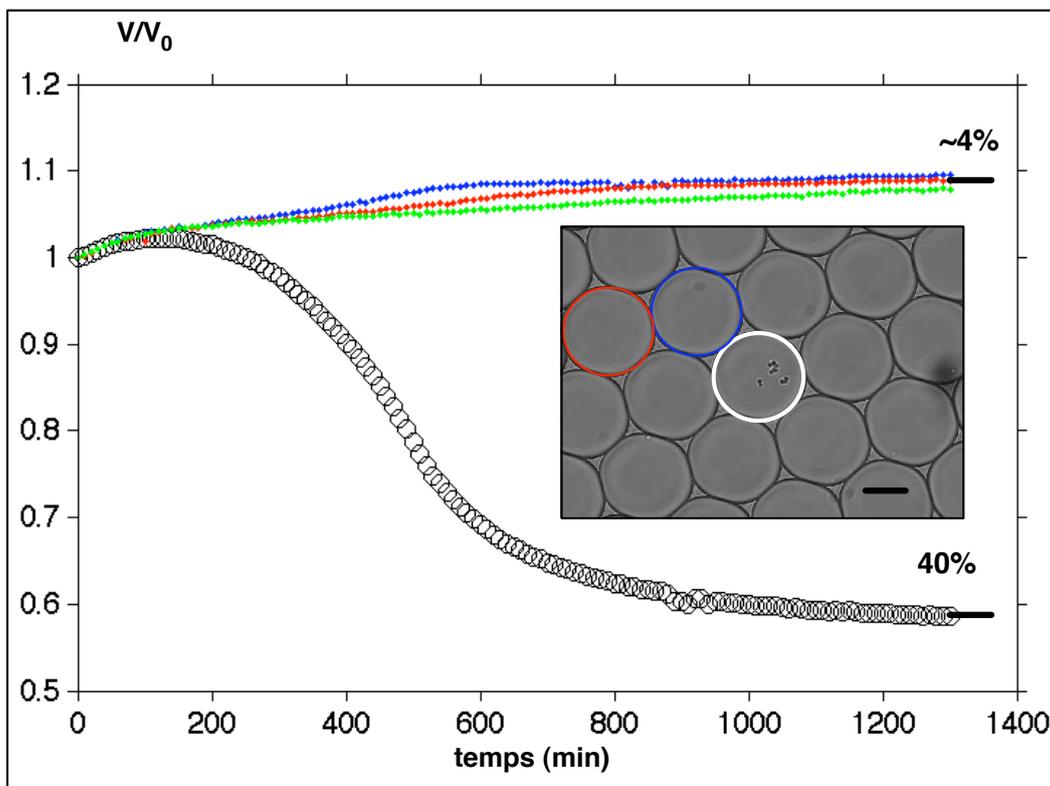


FIGURE 4.1 – Evolution du volume normalisé des gouttes dans un réseau 2D compact en formulation fluorée. L'expérience est réalisée à 30°C dans une chambre de 40 μm d'épaisseur. La goutte cerclée de blanc contient des cellules de *S. cerevisiae* dans du milieu de culture SDall à 20g/L de glucose. Le volume initial est de l'ordre de 120 pL . La courbe bleue représente une goutte en contact, dans la première couronne autour de la goutte contenant les levures. La courbe rouge correspond à une goutte de la deuxième couronne. La courbe verte représente une goutte encore plus loin de la goutte réactive. L'insert présente le réseau de gouttes cerclées par la couleur correspondant à leur courbe. L'échelle fait 50 μm .

tial (mesure du plateau final, à l'état stationnaire). La légère augmentation au début de l'expérience

(~ 200 premières minutes) correspond à la relaxation du système et sera compensée dans la suite par la méthode décrite dans le chapitre précédent. On observe que les gouttes qui entourent la goutte réactive gonflent. Les gouttes au contact (première couronne de 6 gouttes) grossissent plus rapidement que les gouttes dans les couronnes extérieure. A l'état stationnaire, toutes les gouttes vides ont augmenté de ~4% en volume. Sachant que la fraction de gouttes occupées représente environ 10% de l'ensemble des gouttes, on a bien conservation de la masse au sein de notre système. L'eau et le CO₂ s'échangent entre les compartiments pour conserver les potentiels chimiques.

4.1.2 Reproductibilité du phénomène

Nous avons vérifié que le comportement des microbioréacteurs était reproductible lorsqu'ils étaient soumis aux mêmes conditions expérimentales (température, formulation, concentrations initiales). La figure 4.2 présente deux faisceaux de courbes obtenus pour deux expériences réalisées

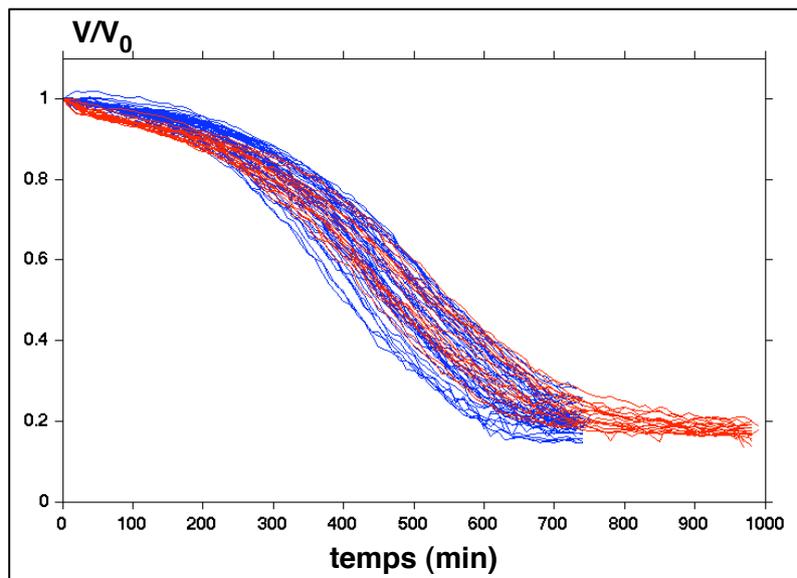


FIGURE 4.2 – Reproduction de l'expérience pour une culture de *S. cerevisiae* dans du milieu synthétique (SDall) contenant 50g/L de glucose. Les expériences sont réalisées dans la formulation adhésive, à 30°C, la profondeur de chambre étant de ~ 25 μ m. Le volume initial moyen des gouttes est de 90pL (courbe rouge) et 60pL (courbe bleue). Pour pouvoir comparer les deux expériences, les volumes sont normalisés par le volume initial. Pour une raison de clarté, seulement une centaine de courbes par faisceau est représentée.

indépendamment de manière identique. Nous utilisons à chaque fois une nouvelle chambre en verre car il n'est pas possible de les recycler (les gouttes sont non seulement adhésives entre-elles, elle finissent par adhérer au verre). Une courbe correspond à l'évolution d'un micro-réservoir. La distribution des courbes sera discutée plus amplement dans la suite de ce chapitre. Elle est due à une

combinaison de la variabilité biologique des cellules, du transport entre les gouttes et de formation des microbioréacteurs (polydispersité).

Les deux faisceaux se superposent validant ainsi la reproductibilité de l'expérience.

4.1.3 Aérobie/anaérobie

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, *S. cerevisiae* est considérée comme une levure à respiration "facultative" c'est-à-dire que même en présence d'oxygène elle utilisera principalement la fermentation pour métaboliser le glucose. Nous avons essayé d'évaluer dans quelle situation se trouvait la levure lorsqu'elle était encapsulée dans une goutte.

Le tableau 4.1 donne les solubilités du dioxygène et du dioxyde de carbone dans l'eau, dans l'huile minérale et l'huile fluorocarbonée.

TABLE 4.1 – Solubilités des gaz dans l'eau, l'huile minérale à [Kubie, 1927] et l'huile fluorée [Carr et al., 2006].

	Solubilité (v/v)
<i>Eau (25°C)</i>	
CO ₂	0.759
O ₂	0.0283
<i>Huile minérale (25°C)</i>	
CO ₂	0.841 ± 0.011
O ₂	0.134 ± 0.004
<i>Huile perfluorée (37°C)</i>	
CO ₂	~ 2
O ₂	~ 0.5

Les gaz sont peu solubles dans l'eau et très solubles dans l'huile perfluorée qui est pour cette raison utilisée comme sang artificiel [Carr et al., 2006]. Sachant que nous travaillons à 30°C, les solubilités dans l'eau et l'huile minérale seront légèrement plus basses que celles présentées. Enfin, la formulation adhésive est un mélange d'huile minérale et d'un additif semi-fluoré dans lequel on ignore les solubilités du CO₂ et du O₂. Pour les calculs d'ordres de grandeur qui suivent, nous nous placerons dans le cas le plus défavorable et prendrons les solubilités dans l'huile minérale seule.

Nous avons alors réalisé une expérience dans laquelle nous avons fait pousser la levure *Kluyveromyces lactis* dans des gouttes adhésives. La souche utilisée est un mutant *rag6*, c'est-à-dire qu'elle est incapable de fermenter et doit donc métaboliser le sucre seulement par la respiration. Nous avons voulu par cette expérience nous rendre compte de la quantité d'oxygène accessible dans le système.

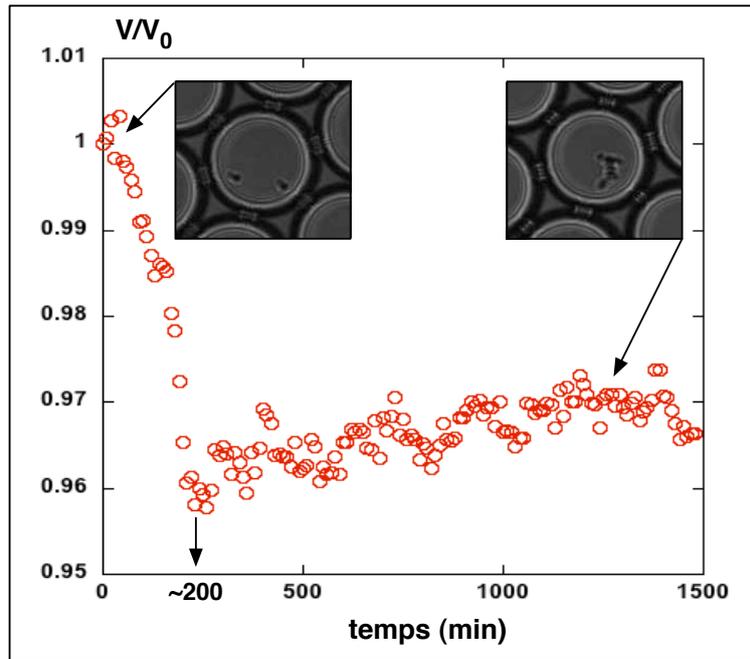


FIGURE 4.3 – Respiration ou fermentation dans les gouttes. Des cellules de la levure *K. lactis* sont encapsulées dans des gouttes d'environ 60pL de milieu de culture SDall contenant 50g/L de glucose. Les gouttes formées dans la formulation adhésive sont stockées à 30°C dans une chambre de $25\mu\text{m}$ de profondeur. Le graphique représente l'évolution du volume normalisé du microbioréacteur. Des levures isolées (image de gauche) se divisent pendant environ 200 minutes. Les cellules forment alors un agrégat (image de droite) dans la goutte dont le volume n'évolue plus.

La figure 4.3 illustre la croissance de *K. lactis* et la variation du volume du microbioréacteur qui lui est associée. La courbe est composée d'une phase de décroissance et d'une phase dans laquelle le volume n'évolue plus. Cela correspond à la croissance par respiration de *K. lactis* suivit d'un arrêt qui pourrait correspondre à l'épuisement total du dioxygène dissout dans l'eau et dans l'huile. La quantité d'oxygène accessible dépend essentiellement de la fraction volumique de gouttes. Moins le système est compact, plus il y aura d'huile et donc de dioxygène. Le temps nécessaire pour consommer tout le dioxygène va dépendre du nombre de cellules dans la chambre. Plus il y aura de cellules plus le dioxygène sera consommé rapidement.

Nous pouvons réaliser un calcul d'ordre de grandeur pour évaluer la quantité d'oxygène nécessaire pour consommer tout le glucose contenu dans les gouttes où les levures se divisent. Si l'on considère : que la fraction volumique en gouttes est de $\sim 60\%$, que seulement 10% de celles-ci sont occupées par des cellules, une chambre de 2cm de long, 1cm de large pour une hauteur de $25\mu\text{m}$ ($V_{\text{chambre}}^{\text{total}} \sim 5\mu\text{L}$), une concentration initiale en glucose de 50g/L , alors $8 \cdot 10^{-8}\text{mol}$ de glucose sont à consommer. Sachant que la respiration d'une mole de glucose nécessite 6 moles de dioxygène [Barnett and Entian, 2005], il va falloir un volume de *ca* $12\mu\text{L}$ de dioxygène. Ce volume est supérieur

au volume de la chambre. On peut donc considérer que le dioxygène est un réactif limitant pour la respiration du glucose dans notre microsysteme.

Remarque : dioxyde de carbone et fermentation Le dernier raisonnement est aussi valable pour le dioxyde de carbone produit par les cellules lors de la fermentation du glucose par *S. cerevisiae*. Plus il y a de cellules plus il y aura de dioxyde de carbone produit. Ce dernier est très soluble dans l'huile et l'eau (TAB. 4.1) mais si trop de gaz est produit alors une bulle peut nucléer dans la chambre qui détruit le réseau. Nous réalisons le même calcul d'ordre de grandeur pour le dioxyde de carbone. On trouve que la consommation de tout le glucose disponible produirait par la fermentation $\sim 4\mu\text{L}$ de CO_2 . Nous sommes à la limite de solubilité dans l'huile, il faudra donc être prudent dans le dimensionnement de l'expérience.

En résumé, notre système permet de travailler en condition d'anaérobiose totale une fois que le dioxygène dissout majoritairement dans l'huile est consommé (ou après dégazage de l'huile). En effet, l'expérience de croissance de *K. lactis* nous suggère qu'après deux divisions il n'y a plus de dioxygène dans la chambre. Pour connaître la véritable teneur en dioxygène accessible aux cellules dans notre système, il faudrait réaliser des expériences complémentaires dans des chimostats où l'on mesure la consommation du dioxygène au cours du temps. En effet, un autre réactif limitant pourrait être à l'origine de l'arrêt de croissance.

4.1.4 Potentiel de notre approche

Pour finir cette partie introductive, nous présentons à titre d'exemple, la croissance d'une souche mutante *cdc28-4* de *S. cerevisiae* à 38°C. Cette expérience ainsi que la précédente ont pour but de démontrer la sensibilité de notre système à des comportements biologiques différents.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre d'introduction sur la levure, les mutants *cdc* présentent la particularité d'avoir une mutation qui ne s'exprime qu'au dessus de la température dite "restrictive". Dans le cas du mutant que nous étudions ici, la mutation porte sur une protéine du cycle cellulaire (Cd28), ce qui nous permet d'arrêter les cellules en phase G1.

On distingue deux comportements. Pour les cellules qui se divisent "normalement" (FIG. 4.4.a, courbe verte), la diminution du volume se fait par une décroissance exponentielle qui s'achève par un plateau. Pour des cellules qui ne se divisent pas mais grossissent (courbes bleue et rouge), le rétrécissement se fait de manière linéaire et se termine aussi par un plateau. On peut les différencier par le nombre de cellules initialement encapsulées dans le microbioréacteur. Les deux comportements (divi-

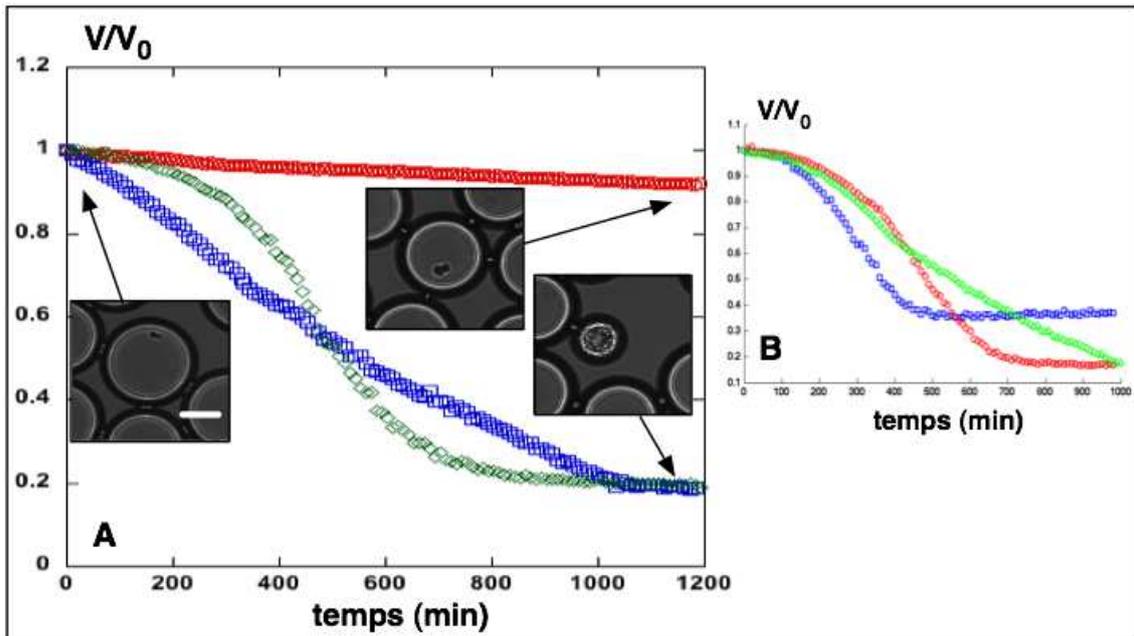


FIGURE 4.4 – Evolution du volume des microbioréacteurs contenant *S. cerevisiae*. L'émulsion est réalisée dans la formulation adhésive et stockée dans une chambre de $25\mu\text{m}$ d'épaisseur. (A) Croissance d'un mutant *cdc28-4* de *S. cerevisiae* à 38°C dans un milieu synthétique (SDall) contenant 50g/L de glucose. Les images présentent des microbioréacteurs à l'état initial et à l'état final. Les volumes initiaux pour les trois gouttes sont identiques, $V_0 \sim 60\text{pL}$. L'échelle est de $25\mu\text{m}$. La goutte contient initialement (\square) : plus de 5 cellules ; (\circ) et (\diamond) : ~ 2 cellules (B) Croissance de la souche de référence GY613 de *S. cerevisiae* à 30°C dans un milieu synthétique (SDall) contenant : (\square) 20g/L de glucose ; (\circ) 50g/L de glucose ; (\diamond) 150g/L de glucose. $70 < V_0 < 100\text{pL}$

sion/ arrêt de division) se traduisent par des réponses différentes et distinguables. Cette expérience est une pierre angulaire dans la compréhension des réponses de notre système vis à vis de la fermentation de la levure et démontre que nous pouvons suivre l'activité d'un faible nombre de cellules.

Nous avons dans un second temps fait pousser *S. cerevisiae* en faisant varier la concentration initiale en glucose dans les microbioréacteurs (Fig. 4.4.b). On observe alors des réponses qui permettent d'identifier des différences de comportement. On retrouve notamment les décroissances linéaires et exponentielles qui traduisent l'état de division des levures. On montre ainsi qu'en fonction de la concentration en glucose, les cellules vont continuer ou s'arrêter de se diviser.

Notre système constitue un système thermodynamique pseudo-fermé, c'est-à-dire qu'il n'échange pas avec l'extérieur mais que les réservoirs échangent entre eux et l'huile qui les entoure. Il permet de travailler dans des conditions d'anaérobiose, ce qui n'est pas toujours facile à réaliser avec les bioréacteurs traditionnels. Enfin, il permet de distinguer par des mesures reproductibles, des colonies qui se divisent de celles qui ne se divisent pas.

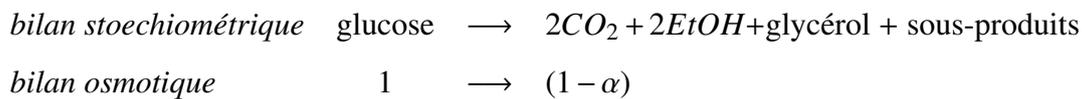
Nous montrerons dans la suite de ce chapitre que la réponse de notre système dans le cas de la croissance de levures est le produit du métabolisme par la division cellulaire.

4.2 Modélisation

Nous développons dans cette partie un modèle qui permet de comprendre les courbes d'évolution du volume des gouttes lorsqu'elles renferment des cellules de *S. cerevisiae*. Nous avons vu dans le chapitre précédent que le moteur du mûrissement des gouttes était la différence de potentiel chimique entre les microbioréacteurs. Dans un premier temps il nous faut donc établir un lien entre le métabolisme des levures et le potentiel chimique dans les microbioréacteurs.

4.2.1 Facteur de conversion osmotique

Tout d'abord, nous allons réaliser les bilans stoechiométriques et osmotiques de la consommation du glucose par la levure.



Pour que le processus de mûrissement se produise, il faut qu'il existe une différence de concentration entre le réservoir qui contient les levures et les réservoirs vides. Cela sous-entend que le bilan de la consommation du glucose se traduise par une diminution du nombre d'espèces dissoutes dans la goutte réactive. Nous introduisons alors un facteur de conversion osmotique α , qui traduit ce déséquilibre.

Nous avons vu que le dioxyde de carbone était très soluble dans l'huile, il est donc probable qu'il s'échappe de la goutte. En ce qui concerne l'éthanol et les autres sous-produits de la fermentation, nous ignorons ce qu'ils deviennent. Quelque soit le mécanisme, nous observons un rétrécissement des gouttes réactives de telle sorte que α est nécessairement positif. Pour simplifier la compréhension, nous avons choisi $\alpha = 1$, *i.e.*, le bilan de la fermentation est qu'une mole de glucose consommé donne zéro mole de molécule active osmotiquement.

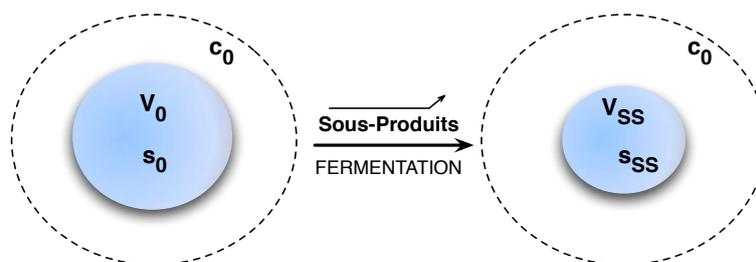


FIGURE 4.5 – Schéma de la contraction osmotique. La goutte réactive est entourée d'un réservoir infini dont la concentration en solutés c_0 reste constante.

Considérons une goutte qui contient des levures, entourée d'une infinité de gouttes vides. On peut écrire à l'état stationnaire, *i.e.*, quand tout le glucose a été consommé et que les réservoirs ont atteint leur état d'équilibre : $\Pi = \text{cste}$, soit

$$\frac{s_0}{V_0} = \frac{s_{SS}}{V_{SS}} \quad (4.1)$$

s_0 et V_0 sont respectivement la quantité de soluté et le volume initial du microbioréacteur. L'indice s_{SS} indique l'état stationnaire ("steady state"). La consommation du glucose entraîne une diminution de la quantité de solutés dissout dans la goutte, ce qui se traduit par une réduction du volume (FIG. 4.5). Ainsi, la mesure du volume final nous informe sur le bilan de solutés consommés. Cette expression est aussi valable à tout instant si, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le transport est suffisamment rapide

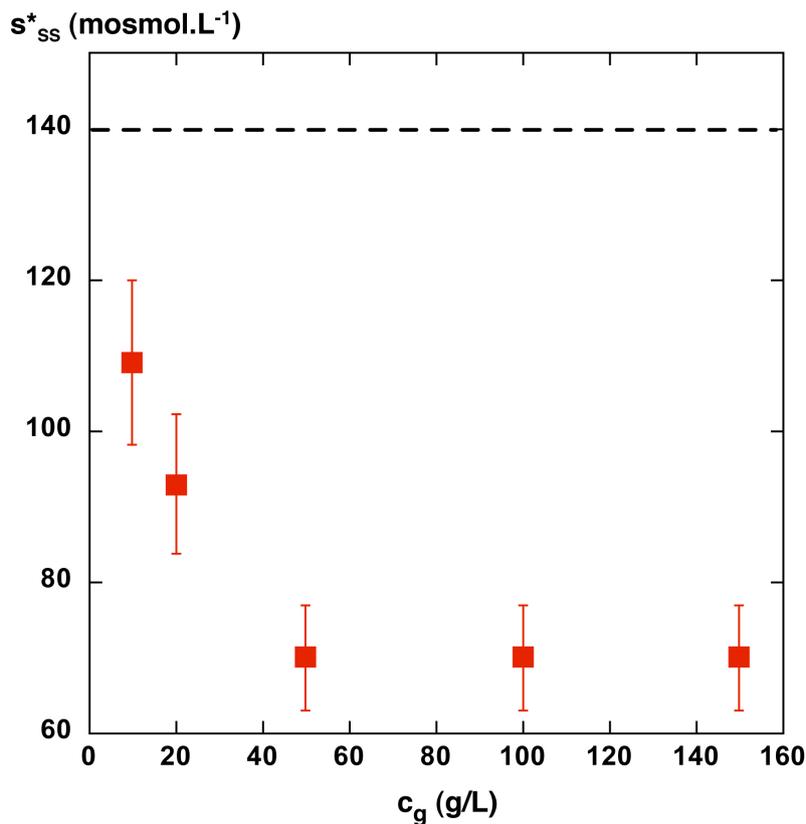


FIGURE 4.6 – Evolution de la quantité normalisée de solutés dissout à l'état stationnaire, s^*_{SS} pour des concentrations initiales en glucose différentes c_g . Les expériences sont réalisées dans la formulation adhésive à 30°C dans une chambre de 25 μm d'épaisseur. $70 < V_0 < 100\text{pL}$. La ligne en pointillé correspond à 140mosmol.L⁻¹ qui est la concentration initiale (1X) en sel et acides aminés dans un milieu synthétique SDall.

Nous représentons sur la figure 4.7, l'évolution de la quantité de solutés dissous à l'état stationnaire, pour différentes concentrations initiales en glucose. Nous introduisons la variable s_{SS}^* qui est la quantité de soluté, normalisée par le volume initial et qui nous permet la comparaison d'une expérience à l'autre dont les volumes initiaux sont différents. Elle est obtenue par l'équation 4.1, en mesurant le volume à l'état stationnaire selon la relation : $s_{SS}^* = c_0 V_{SS}^*$ où $c_0 = \frac{s_0}{V_0} = s_0^*$ est la concentration initiale en solutés dissous et V_{SS}^* le volume à l'état stationnaire normalisé. a donc la dimension d'une concentration (en mosmol.L⁻¹). Nous utilisons comme unité les osmoles car ce sont bien les quantités en espèces dissoutes qui sont importantes. Ainsi, une mole de *NaCl* est équivalente à 2 osmoles.

On observe alors que la quantité d'espèces dissoutes à l'état stationnaire est inférieure à la quantité initiale en "sel" (nous utiliserons le terme "sel" pour désigner les solutés autres que le glucose). Cela signifie qu'une partie des acides aminés et/ou des ions dissous dans le milieu de culture est utilisée pour fabriquer de la biomasse.

En considérant les quantités de solutés dissous dans les gouttes à l'état stationnaire, on peut distinguer deux régimes. Dans le premier régime, la source de carbone (le glucose) est le facteur limitant. C'est le cas pour les expériences à 10g/L et 20g/L de glucose. s_{SS}^* est plus faible dans le cas 20g/L. Plus de cellules ont été synthétisées, car il y a plus de glucose initialement, et ainsi plus de "sel" a été consommé. Dans le deuxième régime, la s_{SS}^* atteint un plateau (70mosmol.L⁻¹). Le réactif limitant n'est plus le glucose. Nous ne connaissons pas la nature de ce substrat limitant mais deux hypothèses semblent les plus probables : c'est la source d'azote qui est limitante (acides aminées), ce sont les ergostérol et acides gras. En effet rappelons que nous travaillons dans des conditions anaérobiques si bien que la cellules ne peuvent synthétiser ni l'ergostérol ni les acides gras.

Le bilan osmotique négatif de la fermentation se traduit par une contraction des microbioréacteurs. L'étude de l'étude stationnaire nous informe sur le réactif limitant la croissance de la levure.

Nous allons proposer maintenant un modèle qui décrit l'ensemble de la courbe de rétrécissement. Ce modèle fonctionne pour les deux régimes mais, par soucis de clarté, nous les présenterons séparément.

4.2.2 Régime avec le glucose comme réactif limitant

Dans le cas où la source de carbone est le substrat limitant, les cellules se divisent jusqu'à l'épuisement total du glucose. On distingue bien sur la figure 4.7 deux phases : une phase de crois-

sance (pour les cellules)/ décroissance (pour le volume) exponentielle et une phase stationnaire. La décroissance du signal de fluorescence correspond au photoblanchiment du rapporteur fluorescent et non à une diminution de la biomasse.

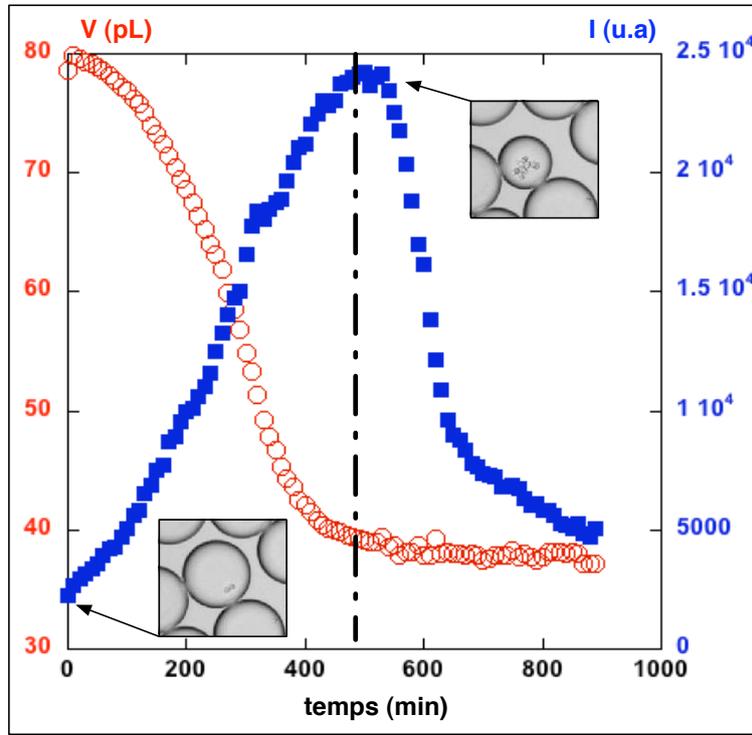


FIGURE 4.7 – Evolution du volume d'une goutte contenant des cellules (○) et du signal de fluorescence (■) qui est un marqueur de la biomasse. L'expérience est réalisée à 30°C dans la formulation adhésive, dans une chambre de 25µm de profondeur pour une concentration initiale en glucose de 20g/L dans du milieu SDall.

Sachant que nous travaillons à potentiel chimique constant, imposé par la concentration initiale en solutés dans les gouttes, la réponse du système est liée directement à l'évolution de la quantité de solutés dissous dans la goutte contenant des levures.

On peut écrire la variation de la quantité de substrat, s :

$$\frac{ds}{dt} = -q\beta = -q_g \beta - q_s \beta \quad (4.2)$$

q a été défini dans le chapitre 1 comme le taux de consommation du substrat (les indices g et s indiquent respectivement le glucose et le "sel") et $\beta = \beta_0 e^{\mu t}$ est la quantité de biomasse. En intégrant 4.2, on obtient l'expression de la quantité de substrat :

$$s(t) = s_0 - \frac{\beta_0}{Y} (e^{\mu t} - 1) = s_0 - \frac{\beta_0}{Y_g} (e^{\mu t} - 1) - \frac{\beta_0}{Y_s} (e^{\mu t} - 1) \quad (4.3)$$

où $Y = \frac{q}{\mu}$ a été défini comme le rendement (massique si les quantités sont exprimées en masse, molaire si elles sont exprimées en mole ou encore énergétique si la quantité de glucose est exprimée en moles d'ATP).

Afin de conserver le potentiel chimique de l'eau constant dans tous les réservoirs, la réponse de notre système à une variation de la quantité de solutés associée à l'activité cellulaire, est une variation du volume par le transfert d'eau entre les réservoirs. Nous avons décrit cet effet à l'état stationnaire (Eq. 4.1). Pour rendre compte de la cinétique du processus, il nous faut considérer la cinétique du transport décrite dans le chapitre précédent. L'équation 3.8 du transport entre deux réservoirs peut s'écrire :

$$\frac{\partial V^*}{\partial t} = -\mathbf{F} \cdot \frac{x_{total}^0}{V_0} \left(\frac{s(t)}{s_0 V^*} - 1 \right) \quad (4.4)$$

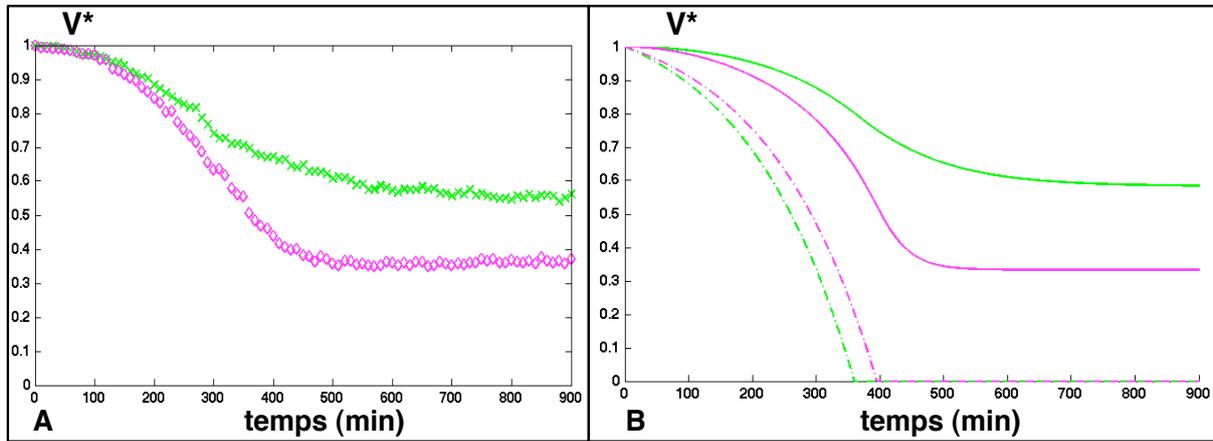


FIGURE 4.8 – Evolution du volume normalisé d'une goutte contenant des levures dans du milieu de culture SDall dans le cas où le glucose est le substrat limitant. L'expérience est réalisée à 30°C, dans la formulation adhésive avec une chambre de 25 μm d'épaisseur. (A) Données expérimentales (\times) : 10g/L de glucose ; (\diamond) : 20g/L. (B) Résolution de l'équation 4.4 avec $\tau = 120\text{min}$, $\mathbf{F} = 4 \times 40\text{pL}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 gouttes vides en contact de la goutte réactive), $Y_g = 10^{-10}$ cellules/g de glucose et $Y_s = 2Y_g$. Les courbes continues représentent les volumes simulés pour 10g/L de glucose (courbe verte) et 20g/L de glucose (courbe magenta). Les courbes en pointillés indiquent la quantité normalisée de glucose dans la goutte au cours du temps, les codes de couleur étant conservés.

En résolvant l'équation 4.4, on peut modéliser la variation du volume d'une goutte contenant des levures se divisant avec un temps de division moyen $\tau = \frac{\ln 2}{\mu}$. Dans notre modèle la quantité de biomasse est donnée en nombre de cellules, on estime alors le rendement cellulaire en divisant le rendement massique moyen pour une culture exponentielle, 0.15g de masse sèche par g de glucose [Larpent, 1990] par la masse sèche moyenne d'une levure (TAB. 1.1). On estime alors $Y_g \sim 10^{10}$ cellules/g de glucose.

La figure 4.8 montre que le modèle développé est en bonne adéquation avec les résultats expé-

rimentaux. On retrouve les tendances et la forme des courbes. Cela nous permet d'utiliser ce modèle pour comprendre et anticiper le comportement des microbioréacteurs en fonction des paramètres du système et des conditions expérimentales. Ainsi on peut tracer l'évolution de la quantité de glucose dans la goutte (lignes pointillés, Fig. 4.8.b). On voit que dans le cas où il y a initialement 10g/L de glucose, le retard du système (contraction osmotique de la goutte) est plus important qu'à 20g/L. Cela peut s'expliquer par le fait que le temps de réponse du système est inversement proportionnel à la fraction molaire initiale de soluté (Eq. 3.9). Aussi, si l'on veut pouvoir suivre la quantité de glucose au cours du temps, il va falloir diminuer ce retard en augmentant par exemple la quantité de glucose initiale.

Remarque sur le taux de croissance μ : Dans le modèle, nous avons considéré le taux de division des levures comme une constante. Le modèle de Monod donne l'évolution de μ en fonction de la concentration en substrat limitant (Eq. 1.4). En prenant un facteur de saturation $K \sim 0.5\text{g/L}$ (valeur

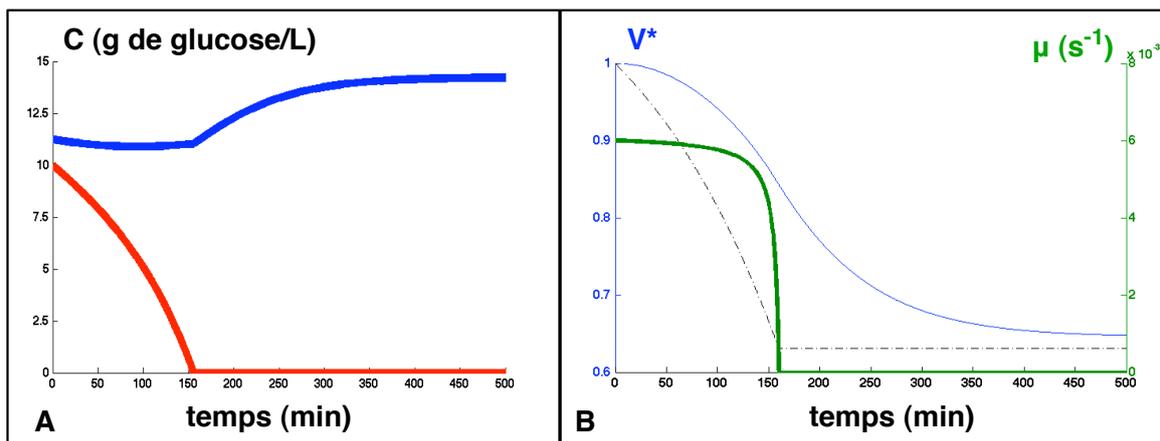


FIGURE 4.9 – Modélisation de l'évolution des concentrations en substrat et du taux de division μ pour une culture dans SDall à 10g/L de glucose. A) Evolution de la concentration en glucose (rouge) et en "sel" (bleu) ; B) Décroissance du volume normalisé (bleu), de la quantité de glucose (pointillés) et du taux de croissance (vert).

moyenne trouvée dans la littérature, [Lievens and Lim, 1982], on voit que cette approximation est justifiée sur la quasi totalité de l'expérience (Fig. 4.9.b). Le taux de croissance peut être considéré comme constant jusqu'à la consommation totale du glucose. Ainsi, contrairement à la culture en batch, il n'y a pas de phase de ralentissement de la croissance avant la phase stationnaire. Nous avons une réponse de type "créneaux" : croissance à la vitesse maximale puis arrêt complet. Le ralentissement de la courbe de volume après la consommation totale du glucose est seulement due au transport.

Nous avons représenté sur la figure 4.9.a la concentration en "sel" dissoute au cours du temps. Il s'agit en fait de la fraction consommable autre que le glucose dans le milieu de culture. La concentra-

tion en mosmoles (mesurée à l'aide d'un osmomètre, [Cottinet, 2010]) est convertie en équivalent g/L de glucose. Nous verrons que le rendement associé à la consommation du "sel" : $Y_s \sim 2 \times Y_g$ (donnés en biomasse/g de glucose). La figure 4.9.b, confirme bien que le glucose est le substrat limitant, substrat qui impose le taux de croissance. La légère augmentation de la concentration en sel (Fig. 4.9.a) est due à la diminution du volume de la goutte.

Lorsque le glucose est le réactif limitant, la contraction osmotique est reliée directement à la croissance exponentielle des levures qui se fait à μ constant.

Nous allons étudier maintenant le cas où ce n'est plus le glucose qui limite la croissance.

4.2.3 Régime où le glucose n'est pas le réactif limitant

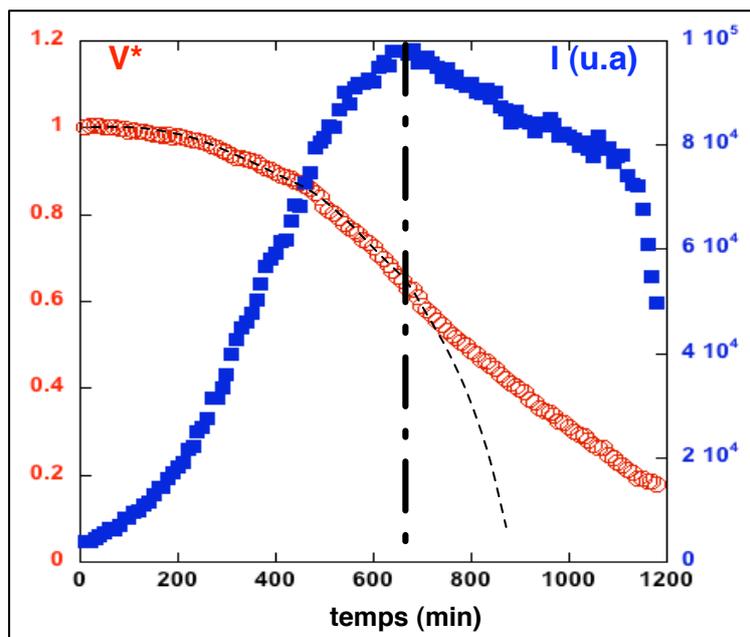


FIGURE 4.10 – Evolution du volume d'une goutte contenant des cellules (\circ) et du signal de fluorescence (\blacksquare) qui est un marqueur de la biomasse. L'expérience est réalisée à 30°C avec la formulation adhésive, dans une chambre de $25\mu\text{m}$ de profondeur pour une concentration initiale en glucose de 20g/L dans du milieu SDall. La courbe en pointillés représente une décroissance exponentielle. La droite en pointillés marque la séparation entre la croissance exponentielle et la phase stationnaire.

Lorsque la concentration en glucose du milieu est augmentée au-delà d'une certaine concentration, un autre substrat est totalement consommé avant le glucose. Le taux de croissance est alors imposé par ce substrat limitant. Nous venons de voir que μ avait la forme d'un créneau tel que les cellules se divisent à une vitesse maximale jusqu'à que le substrat limitant soit épuisé. La division

s'arrête alors quasi-instantanément.

La figure 4.10 présente l'évolution du volume du microbioréacteur et de la biomasse. On observe bien l'arrêt de croissance de la biomasse. Cela coïncide avec un changement de pente de la courbe de volume. Le rétrécissement de la goutte ne s'arrête pas mais continue de manière linéaire. On peut expliquer ce comportement en faisant appel à l'expérience décrite figure 4.4 sur les souches mutantes *cdc*. Ainsi nous avons pu voir une consommation de glucose avec un nombre de cellules constant qui se traduit par un rétrécissement linéaire de la goutte réactive. Il y a un découplage entre la division des cellules et la consommation du glucose.

Nous avons modifié le modèle pour rendre compte de cet effet. On définit un temps "critique", t_c à partir duquel le réactif limitant est totalement consommé. On a alors dans la goutte une quantité de biomasse, β_c qui ne variera plus ($\mu = 0$ au-delà de t_c). Dans l'équation 4.2 on décompose q en ses composantes de croissance et de maintien (Eq. 1.7) et on intègre.

Pour $t \leq t_c$, on retrouve l'équation 4.3.

Pour $t > t_c$,

$$\int_0^t ds = \underbrace{\int_0^{t_c} (q_{cr} + q_m) \beta dt}_{\frac{\beta_0}{Y}(e^{\mu t_c} - 1)} - \underbrace{\int_{t_c}^t q_{cr} \beta dt}_0 - \underbrace{\int_{t_c}^t q_m \beta_c dt}_{q_m \beta_c (t - t_c)}$$

On obtient alors :

$$s(t) = s_0 - \frac{\beta_0}{Y} (e^{\mu t_c} - 1) - q_m \beta_c (t - t_c) \quad (4.5)$$

Le premier terme correspond au glucose et "sel" consommés par les levures en divisions jusqu'à l'arrêt de croissance à t_c . Le glucose qui reste dans la goutte est consommé de manière constante à un rythme qui dépend, de la quantité de biomasse formée avant l'épuisement du substrat limitant, β_c et du paramètre de maintien q_m . On injecte cette expression dans l'équation du transport (Eq. 4.4) pour simuler le comportement des microbioréacteurs.

Les résultats obtenus (Fig. 4.11) par la simulation reflètent bien les données expérimentales. Dans ces conditions concentrées en glucose, l'écart entre la consommation du glucose (courbes en pointillés) et le volume de la goutte (courbes continues) est très faible. On a alors une bonne correspondance entre ΔV et Δs . Le ralentissement du rétrécissement après l'arrêt de croissance indique que la consommation de glucose nécessaire aux cellules en division est supérieure à celle des cellules en phase stationnaire.

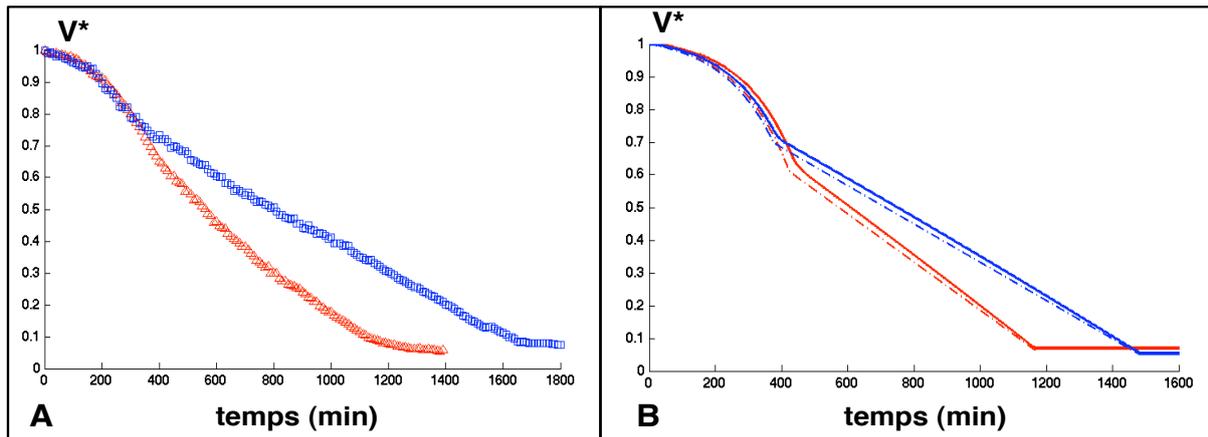


FIGURE 4.11 – Evolution du volume d'une goutte contenant des levures dans du milieu de culture SDall dans le cas où le glucose n'est pas le substrat limitant. L'expérience est réalisée à 30°C, dans la formulation adhésive avec une chambre de 25 μm d'épaisseur. A) Données expérimentales (Δ) : 150g/L de glucose; (\square) : 200g/L de glucose. B) Résolution de l'équation 4.4 avec $\tau = 120\text{min}$, $F = 4 \times 40\text{pL}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 gouttes vides en contact de la goutte réactive), $Y_g = 10^{-10}$, $Y_s = 2Y_g$ et $q_m = 3.6 \cdot 10^{-13}\text{g}$ de glucose par cellule par minute. Les courbes continues représentent les volumes simulés pour 150g/L de glucose (courbe rouge) et 200g/L de glucose (courbe bleue). Les courbes en pointillés indiquent la quantité normalisée de glucose dans la goutte au cours du temps, les codes de couleur étant conservés.

Remarque sur les sous-produits du métabolisme : On peut expliquer la limitation de la production d'éthanol par la levure dans des réservoirs fermés par le fait qu'une partie des sous-produits du métabolisme sont des toxines. Au-delà d'une certaine concentration, ces toxines inhibent la production d'éthanol et deviennent toxiques pour la levure.

TABLE 4.2 – Inhibition par les sous-produits du métabolisme (Extrait de [Maiorella et al., 1983]).

Sous-produit	Concentration d'inhibition*(g/L)	Mécanisme d'inhibition
Ethanol	70	Inhibition directe des voies de métabolisme de l'éthanol
Acide Formique	2.7	Interférence chimique avec les fonctions de maintien de la cellule
Acide acétique	7.5	Interférence chimique
Glycérol	450	Effets sur la pression osmotique

* Réduction de 80% de la biomasse

Le tableau 4.2 présente quelques exemples de sous-produits et les concentrations à partir desquelles elles altèrent le métabolisme de la levure. On aurait donc pu interpréter l'arrêt de croissance par une accumulation de toxines plutôt que par l'épuisement d'un substrat. Toutefois, si cela était vraiment l'accumulation de toxines, alors la réduction de volume de la goutte au cours du temps au-

rait pour effet d'augmenter la concentration des sous-produits, ce qui amplifierait l'inhibition. Or, si après l'arrêt de croissance le volume continue de décroître c'est qu'il y a consommation du glucose, le métabolisme est encore actif. Les toxines produites par le métabolisme de la levure fuient hors de la goutte pour les mêmes raisons que l'eau, *i.e.*, les potentiels chimiques sont constants et parce qu'ils sont suffisamment solubles dans l'huile. L'hypothèse de substrat limitant est alors la seule valable pour expliquer la rupture de pente dans la courbe de rétrécissement des gouttes.

Lorsque le glucose n'est pas le substrat limitant, un découplage s'opère entre la division cellulaire et le métabolisme. L'arrêt de croissance se traduit par un rétrécissement linéaire des microbioréacteurs dont l'intensité est proportionnelle à q_m .

Nous avons développé un modèle qui nous permet de rendre compte du comportement des microbioréacteurs à différentes concentrations en substrat. Pour établir ce modèle nous avons réalisé un certain nombre d'hypothèses que nous avons essayé de valider au fur et à mesure. Il en ressort que la mesure du volume des microbioréacteurs au cours du temps nous donne accès à la consommation de glucose d'une microcolonie dans les conditions expérimentales définies par l'expérimentateur. Nous allons voir comment utiliser notre méthode pour la mesure de paramètres métaboliques associé à la fermentation de *S. cerevisiae*.

4.3 Mesure de paramètres du métabolisme

Nous avons vu dans le chapitre d'introduction sur la biologie de *S. cerevisiae* que l'énergie de maintien, q_m est un paramètre qui reflète l'utilisation du glucose pour d'autres fonctions que la division. Nous avons alors évoqué qu'elle pouvait être un paramètre pertinent pour l'optimisation de procédés industriels. Les méthodes classiques de culture (CSTR) permettent d'évaluer q_m par l'extrapolation des mesures de consommation de glucose de cultures qui se divisent à des taux de division faibles. Alors que ces mesures sont des moyennes réalisées sur de grandes populations, nous proposons une méthode qui permet la mesure directe de q_m à l'échelle de microcolonies, sur un grand nombre d'échantillons en parallèle.

Nous tâcherons dans un premier temps d'expliquer la distribution observée sur les courbes de rétrécissement. Nous établirons ensuite le couplage entre les différents paramètres du modèle. Enfin, nous mesurerons l'énergie de maintenance et discuterons sur le criblage de l'activité métabolique de souches de *S. cerevisiae*.

4.3.1 Sensibilité du système aux paramètres du modèle

Nous allons essayer de répondre à la problématique suivante : quelle est l'influence de chaque paramètre sur le comportement du microbioréacteur ? Pour y répondre, nous distinguerons les deux régimes : glucose limitant et "sel" limitant.

Cultures où le glucose est limitant Pour réaliser cette étude nous avons fixé les paramètres du modèle afin d'obtenir une courbe "maîtresse" qui représente le comportement moyen d'un microbioréacteur. A partir de cette courbe nous avons fait varier les paramètres un à un afin d'étudier la variabilité qu'ils engendraient. L'idée est de décrire la distribution expérimentale des courbes de rétrécissement (Fig. 4.12.a) pour des cultures de *S. cerevisiae* en fonction des paramètres physiques de notre système. Les paramètres biologiques (μ , q_m , Y_g et Y_s) seront discutés ensuite.

Nous avons donc choisi trois paramètres qui étaient susceptibles de varier d'un microbioréacteur à l'autre et qui sont issus du mode de fabrication du système.

- Influence du volume initial V_0 : la polydispersité (~5%) de l'émulsion à l'état initial (lors de la formation) se retrouve à l'état final selon le modèle. Expérimentalement, on trouve que la polydispersité à l'état finale est de l'ordre de 10%. On peut expliquer cette différence par l'erreur de mesure sur le volume commise. Celle-ci est d'autant plus grande que le volume est petit. En outre, V_0 va jouer, dans une moindre mesure, sur le paramètre de transport \mathbf{F} d'après l'équation 3.9.

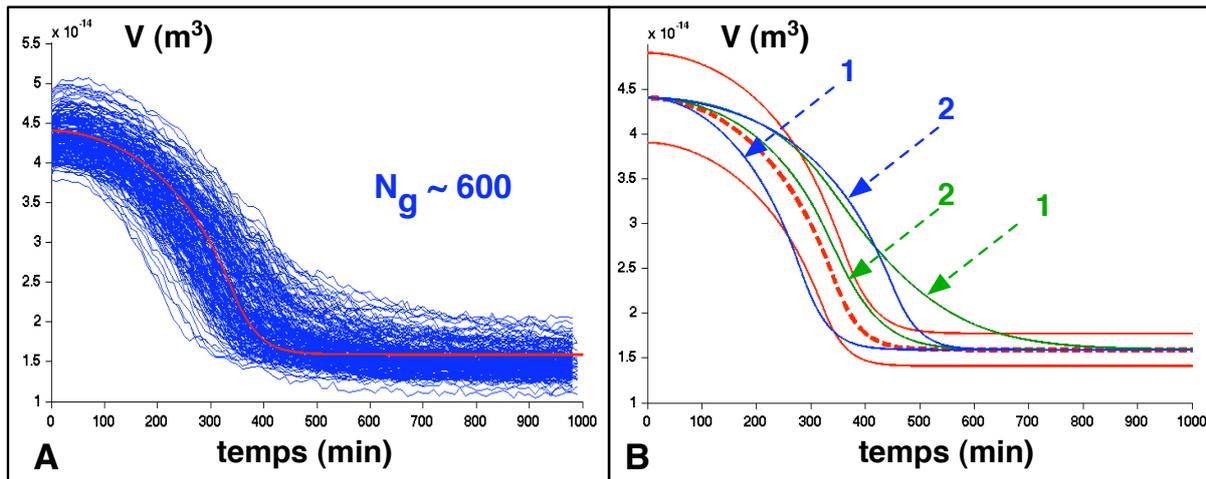


FIGURE 4.12 – Influence des paramètres sur l'évolution du volume des microbioréacteurs. A) Données expérimentales pour une culture dans SDall à 20g/L. L'expérience est réalisée à 30°C, dans la formulation adhésive avec une chambre de 25 μm d'épaisseur. La courbe rouge est donnée par notre modèle, elle représente une courbe référence à partir de laquelle nous faisons varier nos paramètres. Le nombre de microbioréacteurs étudiés est $N_g \sim 600$; B) La courbe référence est tracée en pointillés. Nous faisons varier un paramètre à la fois. En rouge, V_0 ; en bleu, N_0 ; en vert le nombre de contacts n tel que $\mathbf{F} = n \times 40\text{pL} \cdot \text{min}^{-1}$.

- Influence du transport : nous avons simulé le rétrécissement de gouttes dans le cas où la goutte réactive possède 3, 2 ou un seul contact avec les gouttes vides du réseau (courbes vertes, Fig. 4.12.b). On observe alors que l'effet du transport est très important, les courbes s'éloignent fortement de la courbe maîtresse à mesure que l'on diminue le nombre de contacts. Le temps de transport entre les gouttes est trop long dès que la goutte possède moins de 3 contacts. Ceci s'explique par le fait que nous travaillons à des concentrations trop faibles en solutés, si bien que le paramètre de transport pour un contact n n'est pas suffisant pour pouvoir suivre l'évolution de la concentration dans le microbioréacteur.

- Influence du nombre initial de cellules N_0 : nous avons vu que l'encapsulation suivait une loi de Poisson. Pour fabriquer notre système nous prenons une moyenne de 1 cellule pour dix gouttes. Statistiquement nous ne devrions avoir que des gouttes vides ou des gouttes contenant une seule cellule. Dans la réalité, les gouttes possèdent régulièrement plusieurs cellules. La raison majeure est que les cellules de *S. cerevisiae* ne se séparent pas toutes facilement. Elles se séparent seulement après le bourgeonnement de la cellule fille. On a donc dans une goutte entre 1 et 2 cellules selon l'endroit où les cellules sont arrivées dans le cycle cellulaire. On voit alors (courbes bleues, Fig. 4.12.b) qu'une partie importante de la distribution des courbes peut s'expliquer par la distribution du nombre de cellules initialement dans la goutte.

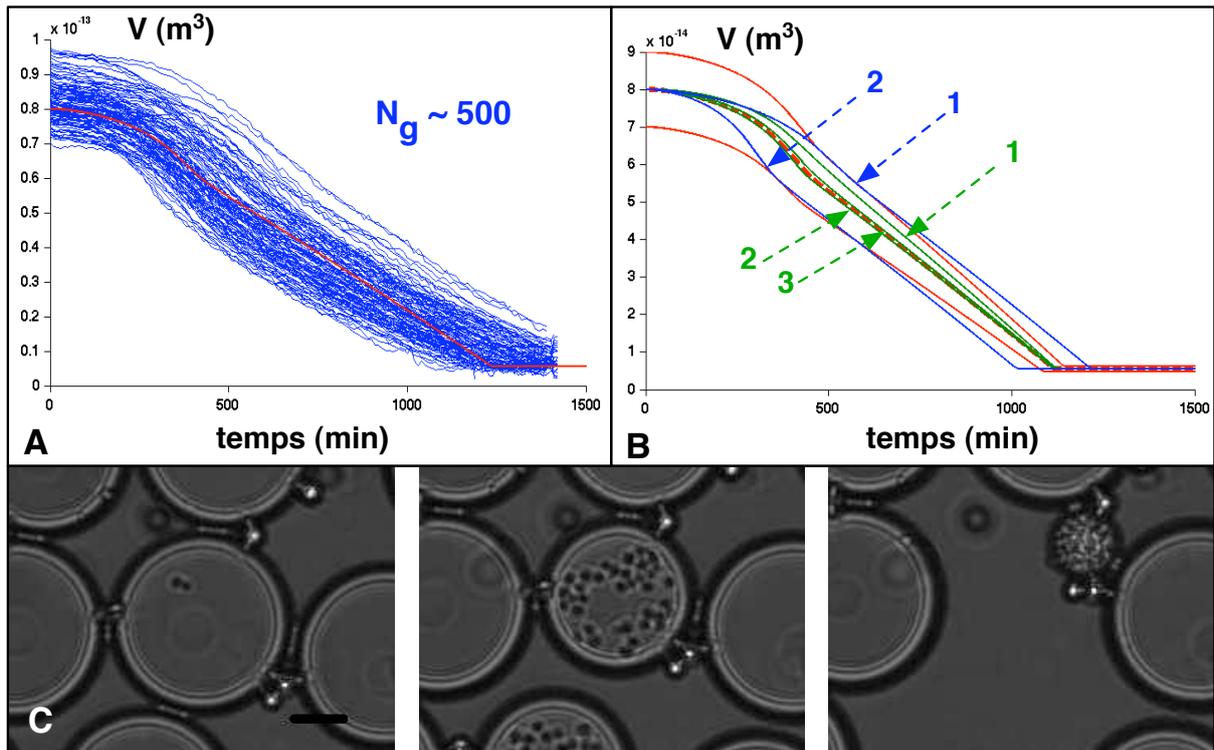


FIGURE 4.13 – Influence des paramètres sur l'évolution du volume des microbioréacteurs. (A) Données expérimentales pour une culture dans SDall à 150g/L. L'expérience est réalisée à 30°C, dans la formulation fluorée avec une chambre de 25 μm d'épaisseur. La courbe rouge est donnée par notre modèle, elle représente une courbe référence à partir de laquelle nous faisons varier nos paramètres. Le nombre de microbioréacteurs étudiés est $N_g \sim 500$; (B) La courbe référence est tracée en pointillés. Nous faisons varier un paramètre à la fois. En rouge, V_0 ; en bleu, N_0 ; vert le nombre de contacts n tel que $F = n \times 40\text{pL}\cdot\text{min}^{-1}$; (C) Perte de contacts adhésifs au cours du temps. De gauche à droite : t_0 , $t = 600\text{min}$; $t = 1000\text{min}$. L'échelle correspond à 50 μm .

Cultures où le glucose n'est pas le substrat limitant De la même manière, nous avons regardé la variabilité des courbes de rétrécissement dans le cas où le "sel" est le réactif limitant.

- Influence du volume initial V_0 : d'après le modèle, on doit retrouver la polydispersité initiale à l'état final. Le faisceau de courbes présenté figure 4.13 apparaît plus épais que le modèle. Cela est trompeur dans la mesure où une partie des courbes n'a pas encore atteint son plateau final. De plus, l'erreur de mesure sur le volume est d'autant plus importante que la goutte a rétréci de près de 90%. Enfin, dans le modèle nous avons considéré un réservoir infini entourant les gouttes. Dans la réalité le nombre de gouttes vide est fini, ce qui impose une légère sous-évaluation du volume final. L'environnement d'une goutte réactive étant variable, l'erreur sur le volume l'est aussi. La mesure du volume au plateau final est donc une mesure relativement bruitée.

- Influence du transport : dans ce régime où le milieu de culture est concentré en glucose, le transport se fait assez rapidement pour pouvoir suivre la consommation du glucose. La seule courbe

qui s'écarte de la courbe maîtresse représente le cas où il n'y a qu'un seul contact. La figure 4.13 présente le mûrissement d'une goutte renfermant des levures. On voit qu'à mesure que la goutte rétrécit, elle perd des contacts. Notre modèle prédit que tant que la goutte conserve plus d'un contact unique, le transport est assez rapide.

- Influence du nombre initial de cellules N_0 : une grande partie de l'épaisseur du faisceau de courbes est expliquée par la distribution du nombre de cellules dans les gouttes (courbes bleues, Fig. 4.13). On observe, aussi bien expérimentalement que par la simulation, que les courbes restent parallèles. Cela implique un résultat important : la pente, dans la partie linéaire des courbes, ne dépend pas ou peu du nombre initial de cellules.

Nos simulations reposent sur le changement d'un paramètre à la fois par rapport à ceux utilisés pour tracer la courbe maîtresse. Dans la réalité, les paramètres varient en même temps et ainsi en combinant la variabilité sur chacun des paramètres nous parvenons à expliquer la variabilité expérimentale.

Nous pouvons rendre compte de la distribution des courbes de rétrécissement des microbioréacteurs par la variabilité des paramètres expérimentaux. Un résultat important est que la pente associée à la consommation de la levure après arrêt de division est conservée quelque soient les paramètres initiaux.

Remarque sur le bruit biologique : nous avons mis de côté la variabilité qui serait issue de la biologie. Nous le justifions par le fait que dans chaque goutte une cellule (ou plus) se divise entre 4 et 6 fois. Le taux de croissance μ est donc une moyenne sur l'ensemble des divisions qui ont lieu dans la goutte. Nous avons montré (Fig. 3.10) que le taux de division dans la goutte était identique à celui en batch (ajustement de la courbe de croissance de la biomasse par une exponentielle).

Par ailleurs, nous avons évoqué dans le chapitre 1 que la différence dans le temps de division d'individu à individu était liée principalement à l'âge de la cellule. Cette variabilité se fera ressentir sur la première division mais plus au bout de plusieurs divisions. Cet effet est donc plus ou moins inclus dans la variabilité sur N_0 si l'on estime qu'une cellule qui se divise plus lentement initialement est équivalent à un N_0 plus petit.

De la même manière, les paramètres de rendement Y_g et Y_s sont, par définition, des paramètres moyens. Nous avons vu sur la figure 4.4 que nous pouvions avoir accès à la consommation de deux cellules. On pourrait donc envisager d'aller étudier la variabilité de consommation à l'échelle de la cellule unique.

Nous considérons que dans une expérience avec des cellules clonales, la variabilité du taux de croissance et des rendements est négligeable devant la variabilité des paramètres du système. Toutefois, si l'on étudie deux souches différentes, on doit être capable de distinguer si elles ont un taux de division ou des rendements différents.

4.3.2 Mesure de l'énergie de maintien

Nous allons montrer pour la première fois une mesure directe de l'énergie de maintien, c'est-à-dire que nous mesurons la quantité de glucose consommé par *S. cerevisiae* lorsqu'elle ne se divise pas. Dans le cas des cultures continues, cette mesure n'est pas possible car si les cellules arrêtent de se multiplier, elles sont alors diluées hors du chémostat par l'apport de milieu de culture frais. Nous montrerons que la mesure de q_m est rendue possible par le découplage entre le métabolisme et la reproduction végétative.

4.3.2.1 Principe de la mesure

La figure 4.14 présente l'allure d'une courbe de rétrécissement dans le cas d'un excès de substrat carboné. Nous avons montré que si la concentration en soluté est suffisamment importante et que le transport est assez rapide (au moins deux contacts adhésifs), on peut considérer que le bioréacteur est en équilibre permanent avec le réservoir de pression osmotique. On a alors la relation suivante qui relie la variation du volume de la goutte réactive à la variation de la quantité de glucose liés au catabolisme :

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \frac{\Delta s}{s_0} \quad (4.6)$$

Le régime avant le point d'inflexion est décrit par l'équation 4.3. On déduit alors de la relation précédente, une équation de décroissance exponentielle :

$$V(t) = V_0 - \frac{V_0 \beta_0}{s_0 Y_g} (e^{-\mu t} - 1) \quad (4.7)$$

Nous nous rendons compte que le couplage entre le taux de croissance, la biomasse initialement présente dans le bioréacteur et le rendement ne nous permet pas de déterminer de manière univoque les paramètres biologiques par un ajustement de l'équation 4.7 de la courbe de rétrécissement.

Nous allons donc nous intéresser à la seconde partie de la courbe, après le point critique. Cette partie linéaire correspond à la consommation de glucose à biomasse constante, β_c . La consommation du glucose est décrite par l'équation 4.5. On déduit de l'équation 4.7, la relation entre la pente p' de

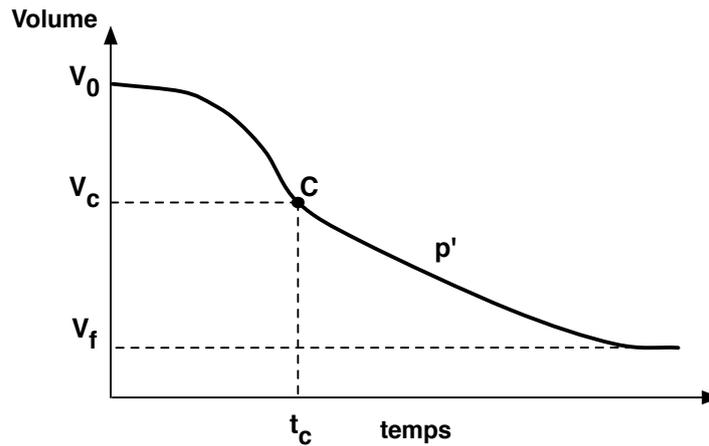


FIGURE 4.14 – Schéma d'une courbe de rétrécissement dans le cas où le glucose n'est pas le limitant. Le point critique C correspond à l'arrêt de la division qui se traduit par un changement d'inflexion.

la courbe dans l'espace des volumes et la pente p dans l'espace des quantités de soluté :

$$p' = \frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{V_0}{s_0} p \quad (4.8)$$

$p = \beta_c q_m$ est le taux de consommation de glucose à l'état stationnaire. C'est le produit de la biomasse créée avec le substrat limitant, β_c , par le taux de consommation spécifique (par g de biomasse), q_m que nous avons défini auparavant comme le paramètre de maintien, *i.e.*, la consommation de glucose nécessaire pour la survie des cellules qui ne se divisent pas. p est exprimé en g/L de glucose consommé par unité de temps (dans notre cas en minutes). Notre système de mesure nous donne accès directement à p . Comment en extraire l'énergie de maintien ? Pour cela il nous faut évaluer β_c .

β_c peut être obtenue de deux manières : par la relation : $\beta_c = \beta_0 e^{\mu t_c}$ ou par le rendement Y_s . Sachant que l'incertitude sur la biomasse initiale, β_0 , est grande, la meilleure méthode consiste à utiliser l'équation 4.9.1. Connaissant Y_s on estime β_c à β_0 près, c'est-à-dire avec une erreur moins grande que par la relation exponentielle.

Y_s est déterminé expérimentalement par la mesure de la biomasse produite dans une culture en "batch" avec un concentration connue en "sel" et un excès de la source de carbone. Contrairement à la consommation du carbone qui dépend des voies métaboliques et peut varier en fonction des conditions expérimentales, on considère que la "polymérisation" de matière est relativement conservée : pour fabriquer une protéine on aura toujours besoin du même nombre d'acides aminés. En d'autres termes, le rendement Y_s est, pour une souche donnée, une constante biologique.

Remarque : On peut extraire deux autres relations de la courbe de rétrécissement.

$$\begin{cases} \frac{\beta_c - \beta_0}{Y_s} = s_0^s & (1) \\ \frac{\beta_c - \beta_0}{Y_g} = (s_0^g - s_c^g) & (2) \end{cases} \quad (4.9)$$

On en déduit alors en combinant (1) et (2) une relation entre les rendements :

$$Y_g = \frac{s_0^s}{s_0^g - s_c^g} Y_s \quad (4.10)$$

où s_0^s et s_0^g sont respectivement les quantités initiales en "sel" et en glucose dissous. s_c^g est la quantité de glucose dans la goutte au point critique, quand tout le sel a été consommé. Elle est déterminée expérimentalement par la mesure du volume à t_c .

4.3.2.2 Détermination expérimentale

La figure 4.15 présente la croissance de la même souche de *S. cerevisiae* dans trois conditions différentes. On observe la même productivité pour les cellules cultivées dans des réservoirs de taille différentes (courbes rouge et bleue). Cela confirme l'indépendance de ce paramètre par rapport au volume initial. Le taux de consommation de la culture dans laquelle la concentration en "sel" a été doublée est multipliée par deux du fait de l'augmentation du nombre de cellules dans la goutte avant l'arrêt de croissance. Le facteur est légèrement supérieur à 2, ce qui peut s'expliquer par une augmentation de l'énergie de maintien avec une teneur en "sel" plus élevée (augmentation de l'énergie consacrée à l'équilibre osmotique entre la cellule et le milieu extérieur).

Mesurons l'énergie de maintien de la culture utilisée : $q_m = \frac{p}{s_0^s \cdot Y_s}$.

Nous estimons $Y_s = 0.20 - 0.30 \text{g(biomasse).g(glucose)}_{eq}^{-1}$ d'où $q_m \sim 2, 3 \text{g(glucose).g(biomasse)}^{-1} \cdot h^{-1}$.

On trouve donc dans l'unité utilisée dans la littérature : $q_m = 13.5 - 20 \text{mmol ATP}_{eq} \cdot (\text{g biomasse})^{-1} \cdot h^{-1}$ ce qui est dans la fourchette haute des valeurs trouvées par d'autres groupes, $0.5 - 17 \pm 2 \text{mmol ATP}_{eq} \cdot (\text{g biomasse})^{-1} \cdot h^{-1}$ dans une culture anaérobique de *S. cerevisiae* [Verduyn et al., 1990a], [Watson, 1970]. Cela vient sans doute du fait que lors de l'arrêt de croissance, les cellules rentrent dans un état stationnaire qui peut être responsable d'une plus grande consommation d'énergie de maintenance que pour des cellules en division.

On évalue le rendement bioénergétique par l'équation 4.10 :

$Y_g \sim 0.46 Y_s$ soit $Y_{ATP} = 10 - 15 \text{g(biomasse).(mol ATP formées)}^{-1}$ qui se situe dans la fourchette des valeurs trouvées par Bauchop et al. [Bauchop and Elsdén, 1960]. En prenant un temps division moyen

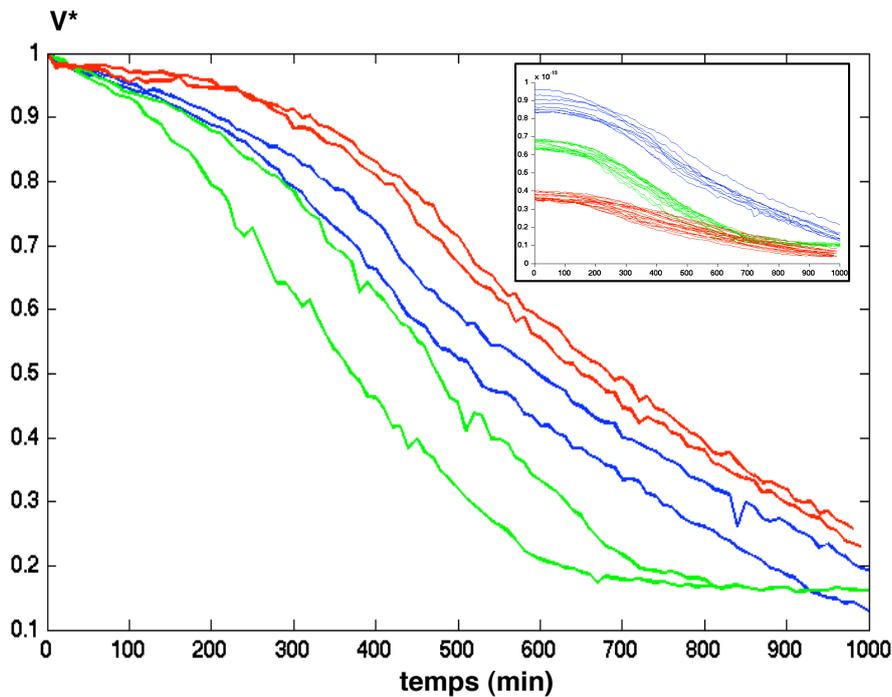


FIGURE 4.15 – Etude des paramètres de maintien pour des cultures de RM11-1D dans SDall à 100g/L. Toutes les expériences sont réalisées à 30°C, dans la formulation fluorée avec une chambre de 25µm d'épaisseur. En rouge et bleu : concentration usuelle en "sel" ; en vert : 2 fois la concentration usuelle en "sel". L'insert illustre les mêmes expériences sans normalisation du volume.

de 100min, on peut déduire le rendement maximum d'après la relation :

$$\frac{1}{Y_{ATP}} = \frac{q_m}{\mu} + \frac{1}{Y_{ATP}^{max}}$$

d'où, $Y_{ATP}^{max} = 14 - 20g(\text{biomasse}).(\text{mol ATP formées})^{-1}$ qui demeure inférieure à la valeur théorique donnée dans le tableau 1.4. Le modèle comprenant l'énergie de maintien n'est donc pas suffisant pour expliquer la totalité de la consommation de glucose par les cellules.

La pente des courbes de rétrécissement (lorsque les cellules ont arrêté de se diviser) constitue une nouvelle méthode simple et direct d'évaluer l'énergie de maintenance à l'échelle d'une population de quelques cellules. Cette mesure est parallélisée sur un grand nombre d'échantillon. On observe alors que les paramètres métaboliques semble relativement conservé pour des cellules cultivées dans des conditions identiques.

Remarque : Mesure de l'énergie des étapes du cycle cellulaire Revenons à l'expérience décrite sur la figure 4.4.a. La courbe rouge illustre la consommation de deux cellules arrêtées en G1. Par l'utilisation de mutants *cdc* qui permettent d'arrêter les cellules dans différentes phases du cycle cellulaire,

on peut envisager d'étudier l'énergétique de chaque étape

Maintenant que nous savons mesurer les paramètres métaboliques, nous allons essayer de leur donner une interprétation du point de vue industriel et voir si nous pouvons utiliser la puissance statistique de notre outil pour sélectionner des souches de levures selon leur performance en terme de fermentation.

4.3.3 Interprétation et applicabilité

La détermination de l'énergie de maintien par la technique que nous avons mise au point et décrite en détail dans la partie précédente nécessite de connaître ou de mesurer le rendement biomassique, Y_S de la souche considérée. Cela n'est pas toujours possible, comme par exemple, pour l'étude de grandes souchothèques (bibliothèque de souches plusieurs milliers d'individus différents). Néanmoins, notre méthode nous permet la mesure à haut débit de la consommation en glucose d'une souche. Nous allons voir comment interpréter le paramètre p et comment utiliser sa mesure dans des problématiques industrielles.

4.3.3.1 Différentiation de souches

Dans un premier temps nous allons vérifier que notre système permet de différencier des microcolonies selon leur capacité à métaboliser le glucose. La figure 4.16 illustre la comparaison de trois souches. On détermine par la pente les taux de consommation de glucose pour chaque souche. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.3.

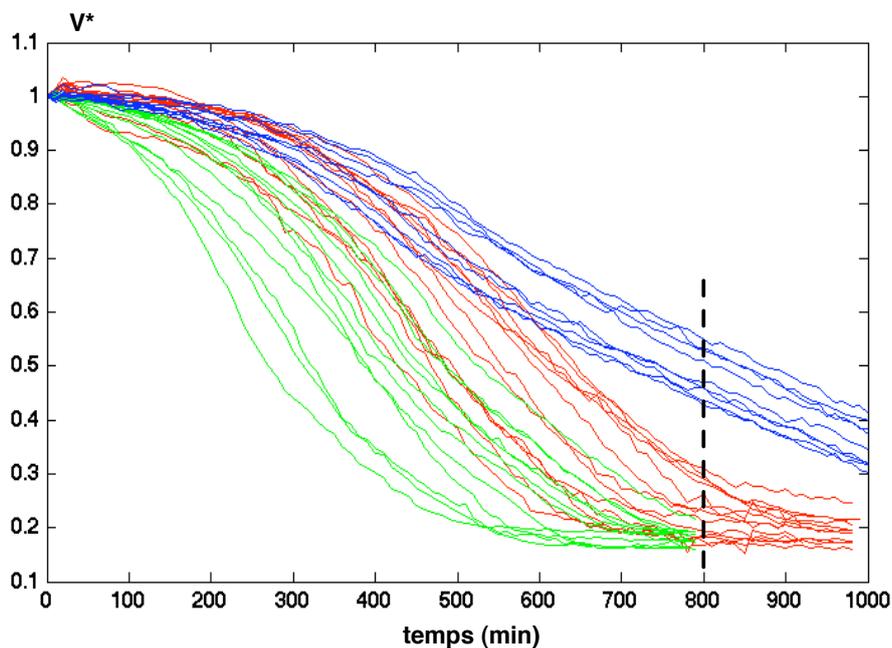


FIGURE 4.16 – Mesure de p pour trois souches différentes dans SDall à 50g/L. Toutes les expériences sont réalisées à 30°C, dans la formulation fluorée avec une chambre de 25 μ m d'épaisseur. En rouge : la souche référence de fond génétique RM11 ; en bleue : GY795, une souche S288c qui ne respire pas ; en vert : GY816, une souche S288c triploïde (3n). Les volumes initiaux étant différents d'une expérience à l'autre ($70 < V_0 < 100 \mu L$) nous représentons les volumes normalisés. Par soucis de clarté, un nombre limité (contenant les extrêmes) de courbes est présenté.

On voit que parmi ces trois souches, GY795 est distinguable par une faible consommation de

glucose des cellules arrêtées dans un état stationnaire. Dans une perspective industrielle, l'idée serait alors d'identifier les individus possédant une haute énergie de maintenance et de les sélectionner comme nous le verrons dans la partie suivante. Toutefois, dans ce cas précis, nous n'avons pas accès aux énergies de maintien car nous n'avons pas de moyen fiable de mesurer les rendements Y_S . Il nous est donc impossible d'interpréter ce résultat en terme de différence d'énergie de maintien. La différence peut autant être liée à un rendement plus faible (ce que semble indiquer nos mesures en batch) qu'à une plus basse énergie de maintenance.

TABLE 4.3 – Taux de consommation de glucose (en $\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) pour les trois souches étudiées.

Souche	Background	p
GY613	RM11	0.085
GY816	S288c (3n)	0.1
GY795	S288c (1n)	0.036

Le taux de consommation p est à rapprocher de la *productivité*, défini comme la quantité de produit formé par unité de temps et qui est le paramètre industriel pertinent dans le cas par exemple de la production d'éthanol par la fermentation. Nous ne pouvons néanmoins pas exprimer de lien direct entre la productivité et p dans la mesure où le glucose consommé par les cellules n'est pas entièrement converti en éthanol et que les voies métaboliques dépendent de la souche et des conditions expérimentales de production.

Si p ne nous informe guère sur la capacité des souches à former un produit, en revanche, il doit être considéré comme l'efficacité de consommation (dégradation) du substrat. A ce titre, il peut être un paramètre de choix pour la sélection d'organismes de biodégradation ou encore capables de métaboliser de nouveaux substrats dans des conditions de plus en plus contraignantes.

4.3.3.2 Vers un criblage à haut-débit

Pour illustrer la sélection de souches par l'utilisation de notre outil, nous emploierons à titre d'exemple la situation illustrée par la figure 4.16. Prenons le cas hypothétique dans lequel nous souhaiterions séparer les souches les plus performantes en terme de consommation de glucose (GY816 et GY613) de la souche la moins performante (GY795).

Si l'on fige le système par exemple à $t=800\text{min}$ (droite en pointillés) on observe une différence d'au moins 10% en volume entre les microbioréacteurs contenant des cellules de GY795 et les microbioréacteurs contenant les deux autres souches. Cette différence n'a un sens seulement si, à

concentration fixée, les volumes initiaux sont identiques (à la polydispersité de formation des gouttes près). Dans le cas contraire, l'effet du volume initial l'emporte et la différence de volume observée n'est plus le fruit d'une activité métabolique différente mais résulte uniquement de la quantité de sucre présente initialement dans les gouttes (Fig. 4.15).

Une fois que les microbioréacteurs ont atteint des volumes distinguables, on peut envisager de les séparer selon leur différence de volume. Les gouttes sont alors injectées dans un microsystème de tri. La séparation "passive" de gouttes selon leur taille a déjà été démontrée par plusieurs auteurs [Tan et al., 2008; Frenz, 2009] et repose sur les écoulements hydrodynamiques qui entraînent les gouttes dans les canaux microfluidiques. Ces méthodes permettent de discriminer les gouttes selon qu'elles sont au-dessus ou en-dessous d'une valeur moyenne (comme des filtres passe-haut ou passe-bas). En revanche, elles n'autorisent pas la sélection d'une taille en particulier (comme avec un filtre passe-bande).

Enfin, pour illustrer le réel potentiel de criblage de notre outil, nous revenons sur un exemple présenté dans l'introduction générale. Comme nous l'avons expliqué, les progrès de la synthèse industrielle de bioéthanol de deuxième génération reposent sur la capacité de *S. cerevisiae* à métaboliser les pentoses. En encapsulant une souchothèque de levures (sauvages et/ou fabriquée par génie génétique, $\sim 10^5$ souches) nous pouvons cribler les individus capables d'utiliser n'importe quelle source de carbone en sélectionnant les gouttes qui auront rétréci. Ce signal de rétrécissement à un instant t est l'intégration de la consommation du glucose sur l'intervalle de temps dt . Pour réaliser cette mesure dans des bioréacteurs classiques, il faudrait pouvoir suivre la cinétique de consommation de glucose ou de production de CO_2 pour chaque individu. Il n'existe donc pas à notre connaissance d'autre technologie qui permette de cribler autant d'individus sur la consommation du glucose.

La mesure du taux de consommation de glucose, déterminé expérimentalement par la pente de la courbe de rétrécissement, permet de différencier des souches selon leur capacité d'assimilation de substrats. Cela permet d'envisager le criblage de grandes bibliothèques de souches afin de trouver des individus qui répondent aux nouvelles problématiques industrielles.

Nous avons démontré que nous pouvions interpréter par une modélisation simple l'évolution des microbioréacteurs en fonction de l'activité métabolique des levures. Il existe une relation univoque qui relie la variation du volume à la consommation de glucose. En cultivant les levures à des concentrations en glucose toujours plus importantes nous sommes arrivés à un régime dans lequel les levures cessent de se diviser. Nous avons alors été capables de mesurer l'énergie de maintien

de microcolonies pour un grand nombre de réservoirs. Nous nous sommes enfin projetés dans une perspective industrielle pour évaluer la possibilité de criblage de souches offerte par cette nouvelle méthode de mesure.

Conclusion générale

Les travaux accomplis au cours de cette thèse au Laboratoire de Colloïdes et Matériaux Divisés résultent d'une volonté de développer et d'utiliser des outils physico-chimiques pour la compréhension de problématiques biologiques.

Nous avons choisi comme objet d'étude ce champignon unicellulaire extraordinaire qu'est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En particulier nous nous sommes intéressés à la fermentation alcoolique à travers la mesure d'un des paramètres du métabolisme : l'énergie de maintenance. Les résultats obtenus s'articulent autour de deux réalisations principales.

Developpement d'un outil de mesure original

Nous avons mis au point un système physico-chimique qui permet de mesurer la polymérisation ou la dépolymérisation au sein de microréservoirs de quelques dizaines de picolitres . Le principe repose sur l'osmose, c'est-à-dire la diffusion, à travers une membrane semi-perméable, de solvant entre des réservoirs qui possèdent des potentiels chimiques différents.

Pour réaliser ce système nous avons fabriqué un réseau de gouttes d'émulsion inverse qui constituent des microréservoirs dans lesquels nous avons encapsulé les levures. Les gouttes ont été organisées en un réseau bi-dimensionnel qui nous a permis de suivre des cinétiques de croissance sur un grand nombre d'échantillons (haut débit).

Nous avons alors élaboré une nouvelle formulation de l'émulsion afin de rendre les gouttes adhésives entre elles. Ceci nous a permis d'imposer les dimensions et les propriétés de transport à l'intérieur des membranes semi-perméables ainsi formées entre les gouttes en contact.

Nous avons alors démontré qu'en imposant des potentiels chimiques constants dans le réseau de gouttes, nous pouvions suivre, à travers l'évolution de leur volumes, la cinétique de processus de polymérisation (création de biomasse dans le cas de la levure) et de dépolymérisation (dans le cas de la lyse enzymatique) qui ont lieu dans des réservoirs.

Mesure direct de l'énergie de maintenance

Nous avons utilisé notre outil pour mesurer la consommation du glucose par *S. cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique en milieu anaérobie. Nous avons ainsi distingué deux comportements suivant que les cellules se divisent ou qu'elles sont en phase stationnaire.

Nous avons développé un modèle qui nous a permis d'expliquer les comportements observés en fonction des paramètres expérimentaux (concentration en sucre, transport) et du métabolisme de la levure. Nous nous sommes alors rendu compte qu'en imposant le réactif limitant nous pouvions mesurer l'énergie de maintenance, c'est-à-dire l'énergie qui n'est pas utilisée pour la division cellulaire.

Nous avons enfin mesuré le taux de consommation de glucose pour trois souches différentes. Nous avons ainsi montré qu'il était possible d'identifier des souches selon leur capacité à métaboliser le glucose. Nous nous sommes alors interrogés sur la possibilité de cribler à haut débit des souches capables de métaboliser des sucres différents. Aussi, nous pouvons envisager, pour augmenter la taille de la librairie à trier, une approche 3D. Les gouttes sont collectées dans une seringue dans laquelle le mûrissement entre les gouttes se produit. Elles sont alors réinjectées dans un microsystème contenant une centaine de zones de tri. Avec un débit d'injection des gouttes de 10kHz, sachant qu'une goutte sur 10 contient une levure, on peut alors cribler une librairie de 10^8 individus différents en moins de 30 minutes.

Le principe de mûrissement des gouttes développé dans cette thèse peut s'appliquer à tout processus qui se traduit par une modification du nombre d'espèces osmotiquement actives. On peut donc envisager de l'utiliser pour un champ vaste d'applications telle que la recherche de nouvelles enzymes de protéolyse.

Enfin, nous aimerions attirer l'attention du lecteur sur l'aspect statistique de cette méthode. Elle offre la possibilité d'étudier des processus de sécrétion ou d'assimilation de plusieurs milliers d'individus isolés. Ainsi, des questions telles que la variabilité entre individus vont pouvoir être abordées.

ANNEXES

ANNEXE A : Microfabrication

La fabrication des systèmes microfluidiques pour la synthèse des gouttes d'émulsion repose sur deux étapes : la fabrication d'un moule suivie du moulage et de l'assemblage du microsystème. Cette technologie est issue du groupe de Georges Whitesides de l'Université d'Harvard. Le lecteur pourra se référer à un grand nombre d'articles sur le sujet pour des explications plus détaillées [Kim et al., 1995; Duffy et al., 1998; McDonald and Whitesides, 2002; Goulpeau, 2006]. Nous nous contenterons de rappeler les principes et de préciser les quelques "astuces" que nous avons employées.

A.1 Photolithographie

Le dimensionnement des canaux a lieu lors de l'étape de photolithographie. Nous réalisons un masque tel que celui représenté sur la figure 3.3 sur lequel est dessiné le motif de notre microsystème. Le moule se constitue d'un "wafer" en silicium sur lequel une résine photosensible a été déposée par spincoating (par rotation à quelques milliers de tours par minute) et gravée photochimiquement. La hauteur est définie par l'épaisseur de la couche de résine. Pour une hauteur typique de $50\mu\text{m}$, la résine SU-8 2050 (Microchem) est étalée à 3000 tours/minute pendant 30 secondes. La résine est dite "positive" c'est-à-dire que l'exposition à la lumière UV engendre sa réticulation. Ainsi la suite des étapes sont une exposition de la résine à travers le masque, plusieurs cuissons pour durcir la résine, le développement chimique (retrait du polymère qui n'a pas été exposé) et finalement une dernière cuisson.

A.2 Lithographie "molle"

La réplique du moule est réalisée en PolyDiMethylSiloxane. Le PDMS (RTV-615, General Electric Corp.) est préparé par le mélange d'une base avec un réticulant dans une proportion de l'ordre 10 :1, cette proportion pouvant être variée selon le module élastique final désiré pour le matériau. Le mélange est coulé sur le moule placé au fond d'un récipient et le tout est placé au four à 70°C pendant au moins une heure pour permettre la réticulation. Le PDMS durci ayant épousé les formes du master est démoulé et découpé. Pour les connectiques, des trous sont percés à l'aide d'un emporte-pièce pour la biopsie (Harris Unicore). Afin de finaliser les canaux, le moulage obtenu doit être collé sur un support. Ce dernier consiste généralement en une surface de verre (hydrophile), ou une surface lisse de PDMS (hydrophobe). Nous avons préféré le collage PDMS-PDMS pour lequel nous avons développé un procédé très reproductible. La face inférieure est placée pendant au minimum 7 minutes dans un

plasma à oxygène. Les groupements en surface sont alors fortement oxydés. La face supérieure est à son tour oxydée dans le plasma pendant une durée plus courte de 30s. Les deux surfaces sont mises en contact et collent de manière irréversible. Des tubes en PEEK (Upchurch Scientific) sont placés dans les trous préalablement percés. Le microsystème ainsi formé est alors placé de nouveau dans le plasma pour une étape longue d'oxydation. L'application d'une époxy-UV va permettre de coller les tubes et d'éviter toute fuite. Enfin, une dernière étape de traitement de la surface des microcanaux est réalisée par l'injection d'une solution contenant un silane perfluoré (Aquadel, PPG Industries, Inc.). Les canaux sont séchés en soufflant de l'azote. Pour toute opération des microsystèmes ainsi formés, une première étape de lubrification des canaux est réalisée en perfusant la phase continue afin de remplir totalement les canaux.

ANNEXE B : Calcul du volume d'une goutte aplatie

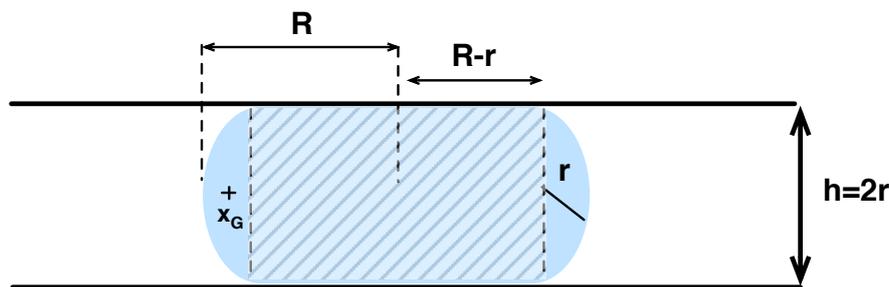


FIGURE B.1 - Schéma d'une goutte aplatie de rayon R dans une chambre d'épaisseur h .

On peut décomposer la goutte en un cylindre (partie hachurée) et un demi-tore (partie non hachurée) tel que :

$$V = V_{cylindre} + V_{1/2\ tore}$$

On calcul le volume du demi-tore par le théorème de Pappus :

$$V_{1/2\ tore} = Ad$$

où A est l'aire du demi-cercle formé par la section du demi-tore est qui est égale à $\frac{1}{2}\pi r^2$; d est la longueur de la circonférence décrite par le centre de gravité G du demi-cercle soit $d = 2\pi x_G$.

$x_G = (R-r) + \frac{4}{3\pi} = R - r\left(1 - \frac{4}{3\pi}\right)$, on en déduit :

$$V_{1/2\ tore} = \pi^2 r^2 \left[R - r\left(1 - \frac{4}{3\pi}\right) \right]$$

sachant que $V_{cylindre} = 2r\pi(R-h)^2$, on déduit enfin pour $R \geq r$:

$$V = 2\pi r(R-h)^2 + \pi^2 r^2 \left[R - r\left(1 - \frac{4}{3\pi}\right) \right]$$

ANNEXE C : Composition du milieu de culture synthétique

TABLE C.1 - Milieu de culture synthétique minimal. La quantité de carbone est variée de 10 à 200g/L. La base azotée est achetée chez Difco Laboratories (Detroit,MI) sous le nom "Yeast nitrogen base without amino acids.

Component	Composition
0.67% Bacto-yeast nitrogen base (without amino acids)	6.7 g
Dextrose	
Distilled water	1000 ml
Amount per liter	
Carbon source:	
Dextrose	
Nitrogen source:	
Ammonium sulfate	5 g
Vitamins:	
Biotin	20 µg
Calcium pantothenate	2 mg
Folic acid	2 µg
Inositol	10 mg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoic acid	200 µg
Pyridoxine hydrochloride	400 µg
Riboflavin	200 µg
Thiamine hydrochloride	400 µg
Compounds supplying trace elements:	
Boric acid	500 µg
Copper sulphate	40 µg
Potassium iodide	100 µg
Ferric chloride	200 µg
Manganese sulphate	400 µg
Sodium molybdate	200 µg
Zinc sulphate	400 µg
Salts:	
Potassium phosphate monobasic	850 mg
Potassium phosphate dibasic	150 mg
Magnesium sulphate	500 mg
Sodium chloride	100 mg
Calcium chloride	100 mg

Pour fabriquer le milieu SDall, nous ajoutons 16 acides aminés selon les proportions données dans le tableau C.2. Le pH est ajusté à 4.8

TABLE C.2 - Composition en acide aminés pour fabriquer le milieu de culture synthétique défini (SDall). Extrait de [Sherman, 2002]

Constituent	Final concentration (mg/L)
Adenine sulfate	20
Uracil	20
L-Tryptophan	20
L-Histidine-HCl	20
L-Arginine-HCl	20
L-Methionine	20
L-Tyrosine	30
L-Leucine	60
L-Isoleucine	30
L-Lysine-HCl	30
L-Phenylalanine	50
L-Glutamic acid	100
L-Aspartic acid	100
L-Valine	150
L-Threonine	200
L-Serine	400

Bibliographie

- Abate, A. R., Poitzsch, A., Hwang, Y., Lee, J., Czerwinska, J., and Weitz, D. A. (2009). Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation. *Phys. Rev. E*, 80(2) :026310–.
- Albers, E., Larsson, C., Liden, G., Niklasson, C., and Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(9) :3187–3195.
- Andreasen, A. A. and Stier, T. J. B. (1953). Anaerobic nutrition of *saccharomyces cerevisiae* .1. ergosterol requirement for growth in a defined medium. *Journal Of Cellular And Comparative Physiology*, 41(1) :23–36.
- Andreasen, A. A. and Stier, T. J. B. (1954). Anaerobic nutrition of *saccharomyces cerevisiae* .2. unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *Journal Of Cellular And Comparative Physiology*, 43(3) :271–281.
- Anna, S. L., Bontoux, N., and Stone, H. A. (2003). Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3) :364–366.
- Arlauskas, R. and Weers, J. (1996). Sedimentation field-flow fractionation studies of composition ripening in emulsion mixtures. *Langmuir*, 12(7) :1923–1925.
- Aronson, M. and Petko, M. (1993). Highly concentrated water-in-oil emulsions : Influence of electrolyte on their properties and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 159(1) :134–149.

- Bai, Y., He, X., Liu, D., Patil, S. N., Bratton, D., Huebner, A., Hollfelder, F., Abell, C., and Huck, W. T. S. (2010). A double droplet trap system for studying mass transport across a droplet-droplet interface. *Lab Chip*, 10(10) :1281–1285.
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690) :1622–1625.
- Balagadde, F. K. (2007). *MICROFLUIDIC TECHNOLOGIES FOR CONTINUOUS CULTURE AND GENETIC CIRCUIT CHARACTERIZATION*. PhD thesis, California Institute of Technology.
- Balagadde, F. K., You, L. C., Hansen, C. L., Arnold, F. H., and Quake, S. R. (2005). Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 309(5731) :137–140.
- Baret, J., Miller, O., Taly, V., Ryckelynck, M., El-Harrak, A., Frenz, L., Rick, C., Samuels, M., Hutchison, J., Agresti, J., et al. (2009a). Fluorescence-activated droplet sorting (fads) : efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab on a Chip*, 9(13) :1850–1858.
- Baret, J. C., Kleinschmidt, F., El Harrak, A., and Griffiths, A. D. (2009b). Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants : A microfluidic analysis. *Langmuir*, 25(11) :6088–6093.
- Barnett, J., Payne, R., and Cambridge, D. (2000). *Yeasts : characteristics and identification*. Cambridge University Press.
- Barnett, J. A. and Entian, K.-D. (2005). A history of research on yeasts 9 : regulation of sugar metabolism1. *Yeast*, 22(11) :835–894.
- Baroud, C., Gallaire, F., and Dangla, R. (2010). Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, 10(16) :2032–2045.
- Bauchop, T. and Elsdén, S. R. (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *Journal Of General Microbiology*, 23(3) :457–469.
- Becker, H. and Gartner, C. (2000). Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, 21(1) :12–26.
- Becker, H. and Heim, U. (2000). Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures. *Sensors and Actuators A : Physical*, 83(1-3) :130–135.

- Bécu, L., G. P. C. A. and Manneville, S. (2005). How does a concentrated emulsion flow ? : Yielding, local rheology, and wall slip. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 263(1-3) :146–152.
- Bendib, S. and Francais, O. (2001). Analytical study of microchannel and passive microvalve - "application to micropump simulator". *Design, Characterization, And Packaging For Mems And Microelectronics Ii*, 4593 :283–291.
- Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2008). *Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Bibette, J., Calderon, F., and Poulin, P. (1999). Emulsions : basic principles. *Reports on Progress in Physics*, 62 :969.
- Boccazzi, P., Zhang, Z., Kurosawa, K., Szita, N., Bhattacharya, S., Jensen, K. F., and Sinskey, A. J. (2006). Differential gene expression profiles and real-time measurements of growth parameters in *saccharomyces cerevisiae* grown in microliter-scale bioreactors equipped with internal stirring. *Biotechnol Progress*, 22(3) :710–717.
- Bongiovanni, C., Dominguez, A., and Chevallier, J. (2000). Understanding images of bubbles. *European Journal of Physics*, 21 :561.
- Breedon, L. L. (1997). [alpha]-factor synchronization of budding yeast. In Dunphy, W. G., editor, *Cell Cycle Control*, volume Volume 283, pages 332–342. Academic Press.
- Bremond, N., Thiam, A. R., and Bibette, J. (2008). Decompressing emulsion droplets favors coalescence. *Physical Review Letters*, 100(2) :024501.
- Bretherton, F. (1961). The motion of long bubbles in tubes. *Journal of Fluid Mechanics*, 10(02) :166–188.
- Brouzes, E., Medkova, M., Savenelli, N., Marran, D., Twardowski, M., Hutchison, J. B., Rothberg, J. M., Link, D. R., Perrimon, N., and Samuels, M. L. (2009). Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 106(34) :14195–14200.
- Cabane, B. and Hénon, S. (2003). *Liquides : solutions, dispersions, émulsions, gels*. Belin.
- Carr, S., Cantor, J., Rao, A., Lakshman, T., Collins, J., and Friedberg, J. (2006). Peritoneal Perfusion With Oxygenated Perfluorocarbon Augments Systemic Oxygenation*. *Chest*, 130(2) :402.

- Cates, M. E., Wittmer, J. P., Bouchaud, J.-P., and Claudin, P. (1998). Jamming, force chains, and fragile matter. *Phys. Rev. Lett.*, 81(9) :1841–1844.
- Cavaliere, D., McGovern, P., Hartl, D., Mortimer, R., and Polsinelli, M. (2003-08-01). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution*, 57 :S226–S232.
- Chabert, M. and Viovy, J. L. (2008). Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 105(9) :3191–3196.
- Chan, P. and Leal, L. (1979). The motion of a deformable drop in a second-order fluid. *Journal of Fluid Mechanics*, 92(01) :131–170.
- Charvin, G., Cross, F. R., and Siggia, E. D. (2008). A microfluidic device for temporally controlled gene expression and long-term fluorescent imaging in unperturbed dividing yeast cells. *Plos One*, 3(1) :e1468.
- Christopher, G. F. and Anna, S. L. (2007). Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal Of Physics D-Applied Physics*, 40(19) :R319–R336.
- Clausell-Tormos, J., Lieber, D., Baret, J., El-Harrak, A., Miller, O., Frenz, L., Blouwolff, J., Humphry, K., Köster, S., et al. (2008). Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms. *Chemistry & biology*, 15(5) :427–437.
- Cookson, S., Ostroff, N., Pang, W. L., Volfson, D., and Hasty, J. (2005). Monitoring dynamics of single-cell gene expression over multiple cell cycles. *Molecular Systems Biology*, 1 :2005.0024.
- Cottinet, D. (2010). Contraction volumique de micro-bioréacteurs signature de l'activité métabolique. Master's thesis, Université Pierre et Marie Curie (Paris).
- Davis, R. H. and Perkins, D. D. (2002). *Neurospora* : a model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3(5) :397–403.
- de Gennes, P., Brochard-Wyart, F., and Quéré, D. (2002). *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Belin Paris.
- De Oliveira, M., Vaughan, B., and Rykiel Jr, E. (2005). Ethanol as fuel : energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. *BioScience*, 55(7) :593–602.

- Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins, R. G., and Toner, M. (2007). Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 104(48) :18892–18897.
- Dollet, B., van Hoeve, W., Raven, J. P., Marmottant, P., and Versluis, M. (2008). Role of the channel geometry on the bubble pinch-off in flow-focusing devices. *Physical Review Letters*, 100(3) :034504.
- Dreyfus, R., Tabeling, P., and Willaime, H. (2003). Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels. *Physical Review Letters*, 90(14) :144505.
- Duetz, W. A. and Witholt, B. (2004). Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. *Biochemical Engineering Journal*, 17(3) :181–185.
- Duffy, D., McDonald, J., Schueller, O., and Whitesides, G. (1998). Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Anal. Chem*, 70(23) :4974–4984.
- Duntze, W., Stotzler, D., Bucking-Throm, E., and Kalbitzer, S. (1973). Purification and partial characterization of alpha-factor, a mating-type specific inhibitor of cell reproduction from *saccharomyces-cerevisiae*. *European Journal Of Biochemistry*, 35(2) :357–365.
- Edd, J. F., Di Carlo, D., Humphry, K. J., Köster, S., Irimia, D., Weitz, D. A., and Toner, M. (2008). Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops. *Lab On A Chip*, 8(8) :1262–1264.
- El-Ali, J., Sorger, P. K., and Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*, 442(7101) :403–411.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., and Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584) :1183–1186.
- Exerowa, D., Kashchiev, D., and Platikanov, D. (1992). Stability and permeability of amphiphile bilayers. *Advances in colloid and interface science*, 40 :201–256.
- Fredrickson, C. K. and Fan, Z. H. (2004). Macro-to-micro interfaces for microfluidic devices. *Lab Chip*, 4(6) :526–533.
- Frenz, L. (2009). *Development, integration and application of modules for droplet-based microfluidics*. PhD thesis, Université de Strasbourg.

- Frenz, L., Blank, K., Brouzes, E., and Griffiths, A. D. (2009). Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines. *Lab Chip*, 9(10) :1344–1348.
- Ganan-Calvo, A. M. and Gordillo, J. M. (2001). Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing. *Phys. Rev. Lett.*, 87(27) :274501–.
- Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A., and Whitesides, G. M. (2006). Formation of droplets and bubbles in a microfluidic t-junction - scaling and mechanism of break-up. *Lab On A Chip*, 6(3) :437–446.
- Gervais, T., El-Ali, J., Gunther, A., and Jensen, K. F. (2006). Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels. *Lab Chip*, 6(4) :500–507.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287) :546–&.
- Goulpeau, J. (2006). *Intégration de puce à ADN dans un microsystème fluïdique*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie (Paris).
- Greene, D., Hopson, J., and Li, J. (2006). Have we run out of oil yet? oil peaking analysis from an optimist's perspective. *Energy Policy*, 34(5) :515–531.
- Groisman, A., Lobo, C., Cho, H., Campbell, J. K., Dufour, Y. S., Stevens, A. M., and Levchenko, A. (2005). A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. *Nat Meth*, 2(9) :685–689.
- Guery, J. (2006). *EMULSIONS DOUBLES CRISTALLISABLES : STABILITE, ENCAPSULATION ET RELARGAGE*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie (Paris).
- Hartwell, L. (2004). Yeast and cancer. *Bioscience reports*, 24(4) :523–544.
- Hartwell, L. H. (1974). *Saccharomyces-cerevisiae* cell-cycle. *Bacteriological Reviews*, 38(2) :164–198.
- Hartwell, L. H., Mortimer, R. K., Culotti, J., and Culotti, M. (1973). Genetic-control of cell-division cycle in yeast .5. genetic analysis of cdc mutants. *Genetics*, 74(2) :267–286.

- He, M. Y., Edgar, J. S., Jeffries, G. D. M., Lorenz, R. M., Shelby, J. P., and Chiu, D. T. (2005). Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets. *Analytical Chemistry*, 77(6) :1539–1544.
- Herskowitz, I. (1988). Life-cycle of the budding yeast *saccharomyces-cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4) :536–553.
- Hertzog, D. E., Michalet, X., Jager, M., Kong, X. X., Santiago, J. G., Weiss, S., and Bakajin, O. (2004). Femtomole mixer for microsecond kinetic studies of protein folding. *Analytical Chemistry*, 76(24) :7169–7178.
- Hollander, J. A. (1993). Kinetics of microbial product formation and its consequences for the optimization of fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63(3) :375–381.
- Holtze, C., Rowat, A., Agresti, J., Hutchison, J., Angile, F., Schmitz, C., Köster, S., Duan, H., Humphry, K., Scanga, R., et al. (2008). Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, 8(10) :1632–1639.
- Huebner, A., Bratton, D., Whyte, G., Yang, M., deMello, A., Abell, C., and Hollfelder, F. (2009). Static microdroplet arrays : a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays. *Lab on a Chip*, 9(5) :692–698.
- Jin, M. H., Feng, X. J., Xi, J. M., Zhai, J., Cho, K. W., Feng, L., and Jiang, L. (2005). Superhydrophobic pdms surface with ultra-low adhesive force. *Macromolecular Rapid Communications*, 26(22) :1805–1809.
- Kabalnov, A. and Weers, J. (1996). Kinetics of mass transfer in micellar systems : surfactant adsorption, solubilization kinetics, and ripening. *Langmuir*, 12(14) :3442–3448.
- Kensy, F., John, G. T., Hofmann, B., and Buchs, J. (2005). Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates. *Bio-process And Biosystems Engineering*, 28(2) :75–81.
- Kim, E., Xia, Y., and Whitesides, G. (1995). Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, 376 :581–584.
- Kortmann, H., Blank, L. M., and Schmid, A. (2009). A rapid, reliable, and automatable lab-on-a-chip interfaced. *Lab On A Chip*, 9(10) :1455–1460.

- Köster, S., Angile, F., Duan, H., Agresti, J., Wintner, A., Schmitz, C., Rowat, A., Merten, C., Pisingano, D., et al. (2008). Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab on a Chip*, 8(7) :1110–1115.
- Kovarova-Kovar, K. and Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells : From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3) :646–666.
- Kubie, L. (1927). The solubility of o₂, co₂, and n₂ in mineral oil and the transfer of carbon dioxide from oil to air. *Journal of Biological Chemistry*, 72(2) :545.
- Kuyper, M., Hartog, M., Toirkens, M., Almering, M., Winkler, A., Dijken, J., and Pronk, J. (2005). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS yeast research*, 5(4-5) :399–409.
- Lagunas, R. (1979). Energetic irrelevance of aerobiosis for *s. cerevisiae* growing on sugars. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 27(3) :139–146.
- Lagunas, R. (1986). Misconceptions about the energy-metabolism of *saccharomyces-cerevisiae*. *Yeast*, 2(4) :221–228.
- Larpent, J.-P. (1990). *Biotechnologie des levures*. Masson.
- Leal-Calderon, F., Schmitt, V., and Bibette, J. (2007). *Emulsion Science : Basic Principles*. Springer.
- Lee, H. L. T., Boccazzi, P., Ram, R. J., and Sinskey, A. J. (2006). Microbioreactor arrays with integrated mixers and fluid injectors for high-throughput experimentation with ph and dissolved oxygen control. *Lab On A Chip*, 6(9) :1229–1235.
- Lee, P. J., Hung, P. J., Rao, V. M., and Lee, L. P. (2005). Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology. *Biotechnology And Bioengineering*, 94(1) :5–14.
- Lievense, J. C. and Lim, H. (1982). The growth and dynamics of *s. cerevisiae*. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 5 :211–262.
- Lord, P. and Wheals, A. (1981). Variability in individual cell cycles of *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 50 :361.

- Luo, C. X., Jiang, L. L., Liang, S. B., Ouyang, Q., Ji, H., and Chen, Y. (2009). High-throughput microfluidic system for monitoring diffusion-based monolayer yeast cell culture over long time periods. *Biomedical Microdevices*, 11(5) :981–986.
- Mabille, C., Leal-Calderon, L., Bibette, J., and Schmitt, V. (2003). Monodisperse fragmentation in emulsions : Mechanisms and kinetics. *Europhysics Letters*, 61(5) :708–714.
- Maharbiz, M., M., Holtz, W. J., Sharifzadeh, S., Keasling, J. D., and Howe, R. T. (2003). A microfabricated electrochemical oxygen generator for high-density cell culture arrays. *Journal of microelectromechanical systems*, 12(5) :590–599.
- Maiorella, B., Blanch, H. W., and Wilke, C. R. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25(1) :103–121.
- Manz, A., Graber, N., and Widmer, H. M. (1990). Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. *Sensors And Actuators B-Chemical*, 1(1-6) :244–248.
- Mazutis, L., Araghi, A. F., Miller, O. J., Baret, J. C., Frenz, L., Janoshazi, A., Taly, V., Miller, B. J., Hutchison, J. B., Link, D., Griffiths, A. D., and Ryckelynck, M. (2009). Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single dna molecule isothermal amplification and analysis. *Analytical Chemistry*, 81(12) :4813–4821.
- McDonald, J. and Whitesides, G. (2002). Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc. Chem. Res*, 35(7) :491–499.
- Mortimer, R. K. and Johnston, J. R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature*, 183(4677) :1751–1752.
- Mueth, D. M., Crocker, J. C., Esipov, S. E., and Grier, D. G. (1996). Origin of stratification in creaming emulsions. *Phys. Rev. Lett.*, 77(3) :578–.
- Nasmyth, K. (2001). A prize for proliferation. *Cell*, 107(6) :689–702.
- Neijssel, O. M. and Tempest, D. W. (1976). Bioenergetic aspects of aerobic growth of *klebsiella aerogenes* nctc 418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat cultures. *Archives of Microbiology*, 107 :215–221. 10.1007/BF00446843.
- Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., and Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys J*, 79(1) :321–327.

- Panikov (1995). *Microbial growth kinetics*. Chapman & Hall.
- Papkovsky, D. B. (1995). New oxygen sensors and their application to biosensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 29(1-3) :213–218.
- Pasteur, L. (1860). Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de Chimie et de Physique*, 58 :323–427.
- Pirt, S. J. (1965). Maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences*, 163(991) :224–&.
- Pirt, S. J. (1979). Fed-batch culture of microbes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 326(1) :119–125.
- Pirt, S. J. (1982). Maintenance energy - a general-model for energy-limited and energy-sufficient growth. *Archives Of Microbiology*, 133(4) :300–302.
- Poulin, P. and Bibette, J. (1998). Adhesion of water droplets in organic solvent. *Langmuir*, 14(22) :6341–6343.
- Poulin, P., Nallet, F., Cabane, B., and Bibette, J. (1996). Evidence for newton black films between adhesive emulsion droplets. *Phys. Rev. Lett.*, 77(15) :3248–.
- Princen, H. (1983). Rheology of foams and highly concentrated emulsions : : I. Elastic properties and yield stress of a cylindrical model system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 91(1) :160–175.
- Ramsey, J. M. (1999). The burgeoning power of the shrinking laboratory. *Nature Biotechnology*, 17(11) :1061–1062.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., and Leao, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts : an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In Peter, G. and Rosa, C., editors, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, The Yeast Handbook, pages 101–121. Springer Berlin Heidelberg.
- Rowat, A. C., Bird, J. C., Agresti, J. J., Rando, O. J., and Weitz, D. A. (2009). Tracking lineages of single cells in lines using a microfluidic device. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 106(43) :18149–18154.
- Rowat, A. C. and Weitz, D. A. (2009). Understanding epigenetic regulation : Tracking protein levels across multiple generations of cells. *European Physical Journal-Special Topics*, 178(1) :71–80.

- Russell, J. B. and Baldwin, R. L. (1979). Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. *Applied And Environmental Microbiology*, 37(3) :537–543.
- Russell, J. B. and Cook, G. M. (1995). Energetics of bacterial-growth - balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews*, 59(1) :48–62.
- Schäpper, D., Alam, M. N. H. Z., Szita, N., Lantz, A. E., and Gernaey, K. V. (2009). Application of microbioreactors in fermentation process development : a review. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 395(3) :679–695.
- Schindler, M. and Ajdari, A. (2008). Droplet traffic in microfluidic networks : A simple model for understanding and designing. *Phys. Rev. Lett.*, 100(4) :044501.
- Schmitz, C., Rowat, A., Köster, S., and Weitz, D. (2009). Dropspots : a picoliter array in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 9(1) :44–49.
- Sessoms, D. A., Belloul, M., Engl, W., Roche, M., Courbin, L., and Panizza, P. (2009). Droplet motion in microfluidic networks : Hydrodynamic interactions and pressure-drop measurements. *Phys. Rev. E*, 80(1) :016317–.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Meth*, 2(12) :905–909.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Guide To Yeast Genetics And Molecular And Cell Biology, Pt B*, 350 :3–41.
- Shim, J. U., Olguin, L. F., Whyte, G., Scott, D., Babbie, A., Abell, C., Huck, W. T. S., and Hollfelder, F. (2009). Simultaneous determination of gene expression and enzymatic activity in individual bacterial cells in microdroplet compartments. *Journal Of The American Chemical Society*, 131(42) :15251–15256.
- Smith, H. and Waltman, P. (1995). *The theory of the chemostat : dynamics of microbial competition*. Cambridge Univ Pr.
- Stephanopoulos, G. (2007). Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, 315(5813) :801–804.

- Stouthamer, A. H. (1973). Theoretical study on amount of atp required for synthesis of microbial cell material. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal Of Microbiology*, 39(3) :545–565.
- Stroock, A. D., Dertinger, S. K. W., Ajdari, A., Mezic, I., Stone, H. A., and Whitesides, G. M. (2002). Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 295(5555) :647–651.
- Sylvestre, J. (2007). *Emulsions inverses cristallisables pour l'évolution dirigée*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie (Paris).
- Szita, N., Boccazzi, P., Zhang, Z. Y., Boyle, P., Sinskey, A. J., and Jensen, K. F. (2005). Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing. *Lab On A Chip*, 5(8) :819–826.
- Tabeling (2003). *Introduction à la microfluidique*. Belin.
- Talia, S. D., Skotheim, J. M., Bean, J. M., Siggia, E. D., and Cross, F. R. (2007). The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature*, 448(7156) :947–951.
- Tan, Y. and Lee, A. (2005). Microfluidic separation of satellite droplets as the basis of a monodispersed micron and submicron emulsification system. *Lab on a Chip*, 5(10) :1178–1183.
- Tan, Y.-C., Ho, Y., and Lee, A. (2008). Microfluidic sorting of droplets by size. *Microfluidics and Nanofluidics*, 4(4) :343–348.
- Tawfik, D. S. and Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*, 16(7) :652–656.
- Taylor, G. (1934). The formation of emulsions in definable fields of flow. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 146(858) :501–523.
- Taylor, P. (1998). Ostwald ripening in emulsions. *Advances In Colloid And Interface Science*, 75(2) :107–163.
- Teh, S. Y., Lin, R., Hung, L. H., and Lee, A. P. (2008). Droplet microfluidics. *Lab On A Chip*, 8(2) :198–220.
- Tempest, D. W. and Neijssel, O. M. (1984). The status of yatp and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Annual Review Of Microbiology*, 38 :459–486.

- Thiam, A. R. (2010). *Émulsions adhésives et non adhésives : Stabilité et propriété des interfaces sondées par la microfluidique*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie(Paris).
- Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., and Quake, S. R. (2001). Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys. Rev. Lett.*, 86(18) :4163–.
- Thuriaux (2004). *Les Organismes Modèles - La levure*. Belin.
- Tian, W.-C. and Finehout, E. (2009). High throughput screening using microfluidics. In *Microfluidics for Biological Applications*, pages 241–269. Springer US.
- Tice, J. D., Song, H., Lyon, A. D., and Ismagilov, R. F. (2003). Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the reynolds and the capillary numbers. *Langmuir*, 19(22) :9127–9133.
- Unger, M. A., Chou, H. P., Thorsen, T., Scherer, A., and Quake, S. R. (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288(5463) :113–116.
- Utada, A. S., Fernandez-Nieves, A., Stone, H. A., and Weitz, D. A. (2007). Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams. *Phys. Rev. Lett.*, 99(9) :094502–.
- Vanapalli, S. A., Banpurkar, A. G., van den Ende, D., Duits, M. H. G., and Mugele, F. (2009). Hydrodynamic resistance of single confined moving drops in rectangular microchannels. *Lab Chip*, 9(7) :982–990.
- Venter, J., Adams, M., Myers, E., Li, P., Mural, R., Sutton, G., Smith, H., Yandell, M., Evans, C., Holt, R., et al. (2001). The sequence of the human genome. *science*, 291(5507) :1304.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., and Vandijken, J. P. (1990a). Energetics of saccharomyces-cerevisiae in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal Of General Microbiology*, 136 :405–412.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., and Vandijken, J. P. (1990b). Physiology of saccharomyces-cerevisiae in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal Of General Microbiology*, 136 :395–403.
- Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A., and Vandijken, J. P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology*, 59(1) :49–63.

- Volfson, D., Cookson, S., Hasty, J., and Tsimring, L. S. (2008). Biomechanical ordering of dense cell populations. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 105(40) :15346–15351.
- Wang, B. L. (2009). *High throughput screen for cells with high extracellular metabolite consumption–secretion rates using microfluidic droplets*. PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology.
- Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M., and Stone, H. A. (2005). Microfluidic flow focusing : Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis*, 26(19) :3716–3724.
- Watson, T. G. (1970). Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *saccharomyces-cerevisiae*. *Journal Of General Microbiology*, 64(NOV) :91–&.
- Wen, L. and Papadopoulos, K. (2000). Visualization of water transport in W1/O/W2 emulsions. *Colloids and surfaces A : Physicochemical and engineering aspects*, 174(1-2) :159–167.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 57(2) :383–401.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101) :368–373.
- Zanzotto, A., Szita, N., Boccazzi, P., Lessard, P., Sinskey, A. J., and Jensen, K. F. (2004). Membrane-aerated microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnology And Bioengineering*, 87(2) :243–254.