



**HAL**  
open science

# Exploration de la cellule unique par des approches biophysiques : de la surface au bioréacteur

Mickaël Castelain

► **To cite this version:**

Mickaël Castelain. Exploration de la cellule unique par des approches biophysiques : de la surface au bioréacteur. Biotechnologies. Institut National Polytechnique de Toulouse, 2024. tel-04783321

**HAL Id: tel-04783321**

**<https://hal.science/tel-04783321v1>**

Submitted on 21 Nov 2024

**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.



---

# EXPLORATION DE LA CELLULE UNIQUE PAR DES APPROCHES BIOPHYSIQUES : DE LA SURFACE AU BIOREACTEUR

---

**Mickaël Castelain**

## **Habilitation à Diriger les Recherches**

soutenue le 8 novembre 2024

Composition du jury :

<b>Thierry Bénézech</b>	Directeur de Recherche INRAe,	UMET, Villeneuve d'Ascq,	Rapporteur
<b>Christophe Coudret,</b>	Directeur de Recherche CNRS,	SoftMat, Toulouse	Président
<b>Jean-Marc Di Méglio</b>	Professeur des Universités,	LMSC, Paris,	Rapporteur
<b>Benjamin Erable</b>	Directeur de Recherche CNRS,	LGC, Toulouse,	Examineur
<b>Renaud Escudié</b>	Directeur de Recherche INRAe,	LBE, Narbonne,	Rapporteur
<b>Emmanuelle Trévisiol</b>	Directrice de recherche CNRS,	TBI, Toulouse	Examinatrice



---

# Exploration de la cellule unique par des approches biophysiques : de la surface au bioréacteur

---

Mickaël CASTELAIN

Habilitation à Diriger les Recherches



# Résumé & Abstract

## Résumé

Je suis chercheur INRAE à Toulouse Biotechnology Institute, sur le site de l'INSA de Toulouse et responsable de l'équipe Transfert-Interface-Mélange (TIM). Mes thématiques de recherche se focalisent sur les mécanismes impliqués dans la formation, la structuration et la cohésion d'un biofilm en conditions d'écoulement cisailé, en s'appuyant sur une démarche d'intégration des différentes échelles spatiales pertinentes, de la protéine de surface à la population bactérienne et temporelles, de l'adhésion initiale au développement du biofilm. Plusieurs volets sont déclinés : (i) analyse des déterminants physico-chimiques et biologiques du microorganisme sur l'adhésion aux surfaces et la structuration du biofilm, (ii) développement de surfaces modulant l'adhésion microbienne et (iii) développement d'outils et méthodes biophysiques. Une nouvelle thématique émergente et soutenue par des actions récentes est le développement d'approches biophysiques pour lever les limitations aux transferts dans les bioréacteurs, des échelles locales aux échelles globales associées aux aspects expérimentaux et numériques. Ce dernier volet fera l'objet de perspectives fortement orientées autour de la cellule unique pour explorer et comprendre l'hétérogénéité du bioréacteur qui seront développées dans le manuscrit et la présentation de cette demande d'*Habilitation à Diriger les Recherches*.

## Abstract

I am an INRAE researcher at the Toulouse Biotechnology Institute, based at INSA Toulouse, and head of the Transfert-Interface-Mélange (TIM) team. My research focuses on the mechanisms involved in the formation, structuring and cohesion of a biofilm under shear flow conditions, based on an approach that integrates the various relevant spatial scales, from surface protein to bacterial population, and temporal scales, from initial adhesion to biofilm development. The project has several components: (i) analysis of the physico-chemical and biological determinants of microbial adhesion to surfaces and biofilm structuring, (ii) development of surfaces modulating microbial adhesion, and (iii) development of biophysical tools and methods. A new emerging theme supported by recent actions is the development of biophysical approaches to overcome transfer limitations in bioreactors, from local to global scales, combined with experimental and numerical aspects. This last aspect will be the subject of perspectives strongly oriented around the single cell to explore and understand bioreactor heterogeneity that will be developed in the manuscript and presentation of this application for *Authorization to direct research*.



# Remerciements

À mes gros cailloux...



# Table des matières

<b>Résumé &amp; Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Introduction</b>	<b>viii</b>
<b>1 Titres et parcours académique</b>	<b>5</b>
1.1 Etat civil . . . . .	5
1.2 Formation universitaire . . . . .	5
1.3 Parcours professionnel . . . . .	5
1.3.1 [2008-2010] : Post-doctorat . . . . .	5
1.3.2 [2010 - 2024] : Chargé de recherche classe normale . . . . .	6
1.4 Activités d'enseignement . . . . .	6
1.5 Encadrement . . . . .	6
1.5.1 Thèses soutenues . . . . .	6
1.5.2 Thèses en cours . . . . .	8
1.5.3 Autres encadrements . . . . .	9
1.6 Implication dans des projets financés . . . . .	12
1.7 Responsabilités collectives . . . . .	15
1.8 Liste des travaux . . . . .	17
1.8.1 Publications internationales . . . . .	18
1.8.2 Manuscrits à soumettre ou soumis . . . . .	20
1.8.3 Publications nationales . . . . .	20
1.8.4 Chapitres d'ouvrage . . . . .	20
1.8.5 Communications orales . . . . .	21
<b>2 Bilan des travaux de recherches</b>	<b>29</b>
2.1 Préambule technique . . . . .	30
2.2 Mécanismes d'adhésion de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur le verre . . . . .	33
2.3 Étude biophysique de protéines de surfaces adhésives de souches pathogènes . . . . .	38
2.3.1 Les pili d' <i>Escherichia coli</i> uropathogène médiateurs de l'adhésion - approche pluridisciplinaire et nanomécanique pour la Molécule Unique . . . . .	38
2.3.2 Biomécanique des pili chez les <i>Streptococci</i> . . . . .	42
2.4 Mécanismes d'interactions flore microbienne/aliment/mucus intestinal : application aux bactéries lactiques . . . . .	45
2.4.1 Caractérisation de la muco-adhésion sur des surfaces abiotiques . . . . .	47
2.4.2 Étude de la migration d'espèces biotiques et abiotiques dans le mucus . . . . .	47
2.4.3 Caractérisation de la muco-adhésion sur des lignées cellulaires mucipares . . . . .	50
2.5 Adhésion microbienne et biofilm . . . . .	52
2.5.1 Les phénotypes d'adhésion sont le reflet de la diversité génotypique de la sous-espèce <i>lactis</i> chez <i>L. lactis</i> pour le développement de biofilm positif dans la machine à traire . . . . .	52

2.5.2	Analyse nanomécanique des pili de <i>L.lactis</i> par Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique . . . . .	53
2.5.3	Analyse des interactions homotypiques des pili de <i>L.lactis</i> par spectroscopie de force à l'échelle de la cellule . . . . .	56
2.5.4	Identification de l'implication des pili dans la formation/structuration d'un biofilm de <i>L.lactis</i> . . . . .	57
2.5.5	Implication des pili dans la résistance d'un biofilm sous écoulement . . . . .	59
2.5.6	Imaginer des surfaces anti-salissures innovantes . . . . .	60
<b>3</b>	<b>Analyse prospective des activités de recherches</b>	<b>69</b>
3.1	Préambule . . . . .	69
3.2	Adhésion et biofilm . . . . .	69
3.2.1	Accumulation de particules biologiques sur un support filtrant : étude dynamique et analyses morphologiques . . . . .	70
3.2.2	Développement de biopesticides durables : rôle de l'adhésion microbienne dans l'intestin du ravageur . . . . .	70
3.3	Lever les limitations aux transferts dans les bioréacteurs par des approches locales	73
3.3.1	Contexte et état de l'art . . . . .	73
3.3.2	Stratégie scientifique . . . . .	78
3.3.3	Compréhension de l'impact des déterminants morpho-physiques de champignons filamenteux et de leur sécrétome cellulolytique dans la dégradation de co-produits agro-industriels par des approches de la cellule unique au bioréacteur - projet Phy4FUN . . . . .	88
	<b>Conclusion</b>	<b>93</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>95</b>

# Table des figures

1	Relations géométriques entre la côte péruvienne, la direction des alizés, et des mouvements d'eau induits : transport d'Ekman et <i>upwelling</i> . D'après Encyclopedia Britannica . . . . .	2
2.1	Schéma représentatif du développement d'un biofilm en fonction du temps . .	29
2.2	Illustration d'une particule piégée dans un faisceau laser focalisé. La particule est tirée vers la position dans la région focale où les forces s'équilibrent. . . .	30
2.3	La description des rayons est illustrée schématiquement pour une particule solide diélectrique sphérique dont l'indice de réfraction est supérieur à celui du milieu environnant. Le faisceau incident a une distribution d'intensité gaussienne illustrée par les couleurs jaune et rouge correspondant respectivement aux faibles et fortes intensités. La flèche verte représente le changement de quantité de mouvement $\Delta P^{bead}$ que subira l'objet en raison de la réfraction du rayon $R_2$ . Sur le côté gauche, les rayons sont collimatés, ce qui entraîne une force de rappel latérale (force de gradient) sur la particule légèrement déplacée vers la gauche ici. L'impact du rayon $R_1$ est nettement plus faible que celui du rayon $R_2$ en raison de l'intensité plus faible à mesure que l'on s'éloigne du centre. Cependant, cette configuration ne constitue pas un piège stable puisque la particule est constamment poussée dans la direction de propagation en raison de la pression de radiation. Sur le schéma de droite, une lentille convergente est introduite (typiquement un objectif de microscope), ce qui conduit à un faisceau fortement focalisé. La particule est ici déplacée dans la direction axiale, ce qui entraîne une force de rappel. Le changement de quantité de mouvement $\Delta P^{bead}$ du second rayon, $R_2$ , annule la contribution latérale de $R_1$ et double l'effet de rappel dans la direction axiale. Cette configuration permet d'obtenir un piège optique tridimensionnel stable avec faisceau unique. Cette figure provient de la thèse d'Oscar Björnham (Umeå University, 2009). . . . .	31
2.4	L'illustration de gauche montre une particule piégée et confinée dans un potentiel harmonique avec une constante harmonique $x$ assimilée à la raideur d'un ressort $\kappa$ , pour un petit déplacement $x$ . La particule peut être envisagée comme si elle était attachée à des ressorts microscopiques (illustration de droite). L'énergie de la particule confinée dans ce potentiel harmonique est alors donnée par $E = \kappa x_i^2/2$ , où $i$ correspond aux directions $x, y, z$ . . . . .	32
2.5	Principe de mesure de la distance de séparation entre la particule piège et sa position d'équilibre dans le volume focal. La particule agit comme une lentille qui réfracte le faisceau lorsqu'elle est déplacée (ou retenue). Le signal est alors mesuré par une diode qui renvoie la valeur de déplacement. . . . .	32
2.6	Spectre de la densité spectrale de puissance de la position d'une particule ( $V/\mu m$ ) en fonction de la fréquence (Hz) pour différentes puissances laser. . .	34
2.7	Dispositif expérimental pour l'étude de l'adhésion-détachement d'une levure individuelle manipulée par la pince optique. Le support d'adhésion peut être horizontal (lamelle de microscope) ou vertical (fragment inséré; cliché sur la figure), échelle 20 $\mu m$ . . . . .	35

2.8	Deux séries de quatre clichés successifs d'une levure à 1,5 mM en NaCl. Les marques blanches (altères et cercles en pointillés) représentent la position de la levure de (a) la vignette 5 et (b) la vignette 10. Barre d'échelle, 5 $\mu\text{m}$ . . . . .	36
2.9	Population de levures adhérentes (%) en fonction de (a) la force ionique et (b) température ( $^{\circ}\text{C}$ ) à 1 h de contact sur la lamelle. . . . .	37
2.10	Proportion de levures détachées (%) en fonction du niveau de force appliqué (pN) pour différentes forces ioniques (mM) $\text{CaCl}_2$ et en NaCl à 1h de contact avec la lamelle, pour une température $T = (25,5 \pm 0,5) ^{\circ}\text{C}$ . . . . .	37
2.11	<b>(A-B)</b> schéma expérimental d'un échantillon monté dans l'environnement de pince optique développé à l'Université d'Umeå. La bactérie est montée sur la bille PS2 (diamètre 9,6 $\mu\text{m}$ ). La bille PS1 (diamètre 3 $\mu\text{m}$ ) est piégée par le faisceau <i>piège</i> (en rouge, quadrillé). Elle fait également office de lentille convergente permettant de focaliser le faisceau <i>sonde</i> (en rouge, plein) sur la photo-diode (PSD). et permet de mesurer la force appliquée (faisceau <i>sonde</i> (en rouge)). <b>(A)</b> système au repos : le faisceau <i>sonde</i> est centré sur la photo-diode et <b>(B)</b> sous contrainte : la particule PS2 est déplacée ; le faisceau <i>sonde</i> est dévié et donne une information de déplacement sur la photo-diode et sur la force appliquée sur la particule PS2). . . . .	39
2.12	<b>(A)</b> Spectre de Force en fonction de l'élongation de pili $S_{II}$ , typique du dépliement de l'hélice, caractérisé par ses trois régions. Ici, la région <i>II</i> n'est pas totalement réversible, <i>i.e.</i> lors du repliement, une différence en force $dF$ est observée. Les clichés AFM représentent sur chacun une bactérie exprimant les pili de type $S_I$ et $S_{II}$ (gènes <i>sfaI</i> et <i>sfaII</i> , respectivement). <b>(B)</b> Essais de relaxation : le pilus est étiré à une vitesse de 40 $\mu\text{m/s}$ , puis maintenu étiré. La force décroît d'un niveau à un autre très rapidement (P, $S_I$ , $S_{II}$ ) ou lente (Type 1) <b>(C)</b> Modèle de l'hélice avec ses trois configurations caractéristiques (Région I, II, et III correspondantes à la partie A). . . . .	41
2.13	<b>a.</b> Spectre de force (force vs. élongation obtenu à 100 $\text{nm/s}$ , inférieure à la vitesse seuil ; courbes noire - aller et grise -retour). Les autres courbes de couleurs correspondent à l'élongation du même pilus à des vitesses supérieures, jusqu'à la <i>région III</i> . <b>b.</b> Analyse spectrale (DFS) la force de dépliement en <i>région II</i> en fonction de la vitesse d'étirement. Chaque point est la moyenne de 3 à 15 expériences. L'intersection entre les deux régressions linéaires correspond à la vitesse seuil $\dot{L}^*$ et est également modélisée par l'équation 2.7. <b>c.</b> Essai de relaxation d'un pilus soumis à une force d'étirement opérée à une vitesse supérieure à $\dot{L}^*$ sur une distance typique de 1,5 à 3 $\mu\text{m}$ . Etape 1 : Le pilus est étiré à la vitesse imposée. Le niveau de force $F_{UF}^D$ correspondant est atteint et suit un plateau tant que le pilus est étiré. Étape 2 : Le système s'arrête et le niveau de force recouvre son état $F_{UF}^{SS}$ d'équilibre à l'étape 3. La courbe en pointillée rouge est modélisée par l'équation 2.8 pour obtenir les constantes de longueur de liaison $\Delta x_{AT}$ et la fréquence de transition de changement d'état $\Delta\nu_{AB}$ . . . . .	43
2.14	Spectre de force de pili T4 de <i>Streptococcus pneumoniae</i> . La courbe rouge indique la phase d'étirement et la courbe verte le retour. En pointillé noir, le modèle WLC ajusté à partir de l'équation 2.9 permettant de déterminer les longueurs de contour $L_c$ et de persistance $L_p$ pour chaque segment. . . . .	45
2.15	<b>A</b> et <b>D</b> : Image en microscopie électronique à balayage de la pointe AFM sur laquelle sont fixées des souches de <i>L. lactis</i> . <b>B</b> et <b>E</b> : Histogrammes des fréquences d'occurrence (%) pour des force d'adhésion (nN). <b>C</b> et <b>F</b> : Spectres de force. Souches TIL448 (A-C) exprimant des pili et des protéines à domaines MUB et TIL1230 (D-F) curée de plasmides et n'exprimant ni pili ni MUB à sa surface pour contrôle. . . . .	48

2.16	<b>A.</b> Distribution des coefficients apparents de diffusion, $D_a$ pour des billes de 500 nm de diamètre, carboxylées (ligne continue) ou PEGylées (ligne pointillée) dans du PGM à 0,5% (rouge) ou 5% (noir) en concentration (m/v). <b>B.</b> Module visqueux $G''$ (symboles vides et ligne pointillée) et module élastique (symboles pleins et ligne continue) en fonction de la fréquence dans le cas de PGM 5% (m/v) en géométrie cône-plan (lignes rouges), micro-rhéométrie auto-corrélée (carrés) et à corrélation croisée (triangles) avec des billes de 500 nm PEGylées.	49
2.17	Dispositif de suivi du front de diffusion $x$ de souches de <i>L.lactis</i> dans un gel de mucus, confiné dans une cellule de Hele-Shaw (1), au moyen d'une caméra (2), d'une source lumineuse par mannequin LED (3) et d'un système d'acquisition (4).	50
2.18	Profils $GV$ de front de diffusion de la souche TIL1290 dans du PGM 0.5 % en fonction de la distance parcourue $x$ (mm) et du temps (couleurs de courbes), ici de 1000 s à 40975 s. . . . .	51
2.19	Topologie des pili et souches utilisées. Le symbole $\Delta$ correspond à la délétion d'un gène impliqué dans la production de l'élément suivant. Exemple : $\Delta A$ : délétion de la piline A . . . . .	54
2.20	<b>A.</b> Photographie par microscopie électronique à balayage de plusieurs bactéries <i>L. lactis</i> présentant un phénotype pilié. Les pili mesurent quelques nanomètres d'épaisseur et peuvent atteindre jusqu'à 3 $\mu\text{m}$ de long (flèches noires). <b>Barre d'échelle</b> : 500 nm. <b>B-C.</b> Une analyse d'image montre une importante flexibilité de ces pili. . . . .	54
2.21	<b>A.</b> Courbe expérimentale modélisée par WLC (equation 2.9) d'un pilus individuel en cours d'élongation (nm) lorsqu'il est soumis à une force transmise par une particule (1 $\mu$ piégée optiquement. <b>B.</b> La position verticale de cette particule sonde est suivie en même temps pour s'affranchir de tout artefact de mesure et détecter un glissement du pilus sur la particule. . . . .	55
2.22	Mesure de force de détachement de cellules piliées (gauche) ou non (droite) au moyen de l'AFM. Ligne du bas : lactocoque produisant des pili (long filament) en AFM (1 <sup>re</sup> colonne) et en TEM (2 <sup>e</sup> ) et n'en produisant pas (3 <sup>e</sup> et 4 <sup>e</sup> figure) . .	58
2.23	Biofilm de lactocoques produisant des pili (Pil+ : <b>a-c</b> ) ou non (Pil- : <b>d-f</b> ). Imagerie confocale des biofilms en 1 <sup>ère</sup> colonne ( <b>a</b> et <b>d</b> ), tests d'élasticité et de topographie par AFM ( <b>b</b> et <b>e</b> ) et correspondance en module d'Young avec spectres de force représentatifs en inserts ( <b>c</b> et <b>f</b> ) . . . . .	59
2.24	Images en microscopie à fluorescence des biofilms obtenus après 24h d'écoulement pour les souches de <i>L. lactis</i> et leurs représentations schématiques. A gauche : les biofilms alimentés avec un milieu riche à 2 mL/min (0.4 Pa) après 24h, à droite : les biofilms alimentés avec le milieu dilué et à 5 mL/min. Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués à l'éosine à 2 %. . . . .	61
2.25	Images de microscopie à fluorescence montrant la persistance des biofilms des souches de <i>L.lactis</i> avant et après écoulement sous des débits de 5, 10 et 20 mL/min. Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués par l'éosine à 2 %. . . .	62
2.26	Figure regroupant la stratégie du projet. Les surfaces en film mince sont évaluées pour leur caractère anti-adhésif par <i>Analyse des Composantes Principales</i> (ACP) selon les indicateurs suivants : Angle de contact $\theta$ , la contrainte de cisaillement à la paroi $\tau_p^{50}$ - pour laquelle 50% d'une population se détache à une contrainte à la paroi donnée $\tau_p$ - la rugosité $R_q$ et la proportion d'atome d'azote à la surfaces $\%at.N$ caractérisée par XPS. A noter que le potentiel zêta $\zeta$ ne figure pas ici. . . . .	64
2.27	<b>A.</b> Angles de contact à l'eau (degré) et <b>B.</b> potentiel $\zeta$ (mV) des surfaces de silice fondue f-SiO <sub>2</sub> , et revêtues par TiO <sub>2</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> et Parylène C sans traitement (barres bleues) ou exposées à la BSA (barres oranges). Les barres d'erreur sont les écart-types sur les classes de données ( $n=3-10$ par condition). . . . .	65

2.28	Schéma méthodologique décrivant la conception des enzymes immobilisées sur une surface de silice fondue et leur caractérisation par essais d'adhésion/détachement en chambre à écoulement cisailé. . . . .	66
2.29	Comparaison des forces d'interaction obtenues par AFM contre différentes surfaces enrichies en ZnO pour des espèces <i>Candida glabrata</i> et <i>Saphylococcus aureus</i>	68
3.1	Dispositif de visualisation d'une cellule de filtration 2D au moyen d'un microscope horizontal à épifluorescence. La cellule de filtration est un microsystème constitué de fentes micrométrique permettant le suivi de l'accumulation de particule/ microorganismes par vue de côté (approche 2D). . . . .	71
3.2	Exemples de géométrie des puces microfluidiques de filtration frontale utilisées dans le projet PHYS-CAKE. Photos par imagerie MEB (vignettes du haut) permettant de démontrer d'un important rapport d'aspect [hauteur / largeur] constituant un soit un verrou technologique. Le flux hydrodynamique est symbolisé par les flèches bleues. . . . .	71
3.3	Exemple de diagramme permettant de dégager les approches multi-échelles pour appréhender l'hétérogénéité du bioréacteur. Plusieurs workpackage (WP1-WP5) impliquant plusieurs compétences de l'équipe TIM et deux thèses. Ce projet vise à créer une plateforme d'analyse de l'hétérogénéité en couplant les échelles et les approches numériques et expérimentales. . . . .	74
3.4	Simulation d'un microsystème fluide avec un profil de concentration en glucose (haute concentration vers le rouge) [102] . . . . .	79
3.5	Suivi du processus de bourgeonnement d'une seule levure piégée à une puissance de 110 mW et sous flux hydrodynamique à 500 nl/min. . . . .	80
3.6	Nanocapteurs d'oxygène à partir de nanoparticules fonctionnalisées au Ruthenium attachés à la surface de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [163]. . . . .	82
3.7	Exemple d'analyse de la transition levure-hyphes de <i>Yarrowia lipolytica</i> lorsqu'elle est exposée à un environnement différent en utilisant la microfluidique (encart A) pour suivre toute modification morphologique (encart B) des cellules piégées, disposées sur une rangée pour faire face au flux de manière égale (encart C). . . . .	83
3.8	Une cellule individuelle peut être manipulée en utilisant HOT pour passer d'un milieu A à un milieu B par un mouvement oscillant périodique. La cellule est ainsi soumise à une impulsion périodique de certaines conditions environnementales (pH, oxygène, température, nutriments) au fil du temps, en modulant l'amplitude ( $A$ ), la fréquence ( $f$ ), la durée de l'impulsion ( $t_i$ ) au-dessus ou en dessous d'une condition de référence (ligne pointillée), et la durée de repos ( $t_{rest}$ ). 86	
3.9	<i>Aspergillus niger</i> FEC130 (collection FIRI [183]) cultivé en milieu solide (PDA), objectif x20, barre échelle 50 $\mu\text{m}$ . . . . .	90
3.10	<b>A.</b> Exemple de dispositif microfluidique permettant le positionnement de spores (codinias) individuels à l'entrée d'un canal au moyen de la pince optique et suivi de la germination puis de la croissance (élongation) de formes hyphales (mycélium) en fonction du temps et du gradient en pH/ $pO_2$ et/ou Température ( $T_p$ ), qu'il soit constant ou fluctuant (courbe en créneau). <b>B.</b> Suivi de mycelia de <i>Trichoderma reesei</i> , en condition de gradient de glucose pour suivre la production de secrétome (extrait de Ref.[187] . . . . .	92

# Liste des tableaux

2.1	Contraintes de cisaillement à la paroi $\tau_p^{50}$ pour les 4 types de surfaces analysées conditionnées avec de la BSA (+BSA) ou nues (bare) utilisant des billes chargées positivement ( $\text{NH}_2$ ) et négativement ( $\text{COOH}$ ). Si la population détachées est inférieure à la moitié, l'indicateur $\tau_p^{50}$ est marqué <i>non atteint</i> (n/a) . . . . .	65
2.2	Contraintes de cisaillement à la paroi $\tau_p^{50}$ pour les différentes étapes fonctionnalisation de surfaces (nue, [+BSA], [+Subtilisin] et [+Subtilisin+BSA] utilisant des billes chargées positivement ( $-\text{NH}_2$ ) et négativement ( $-\text{COOH}$ ). Si la population détachée est inférieure à la moitié, l'indicateur $\tau_p^{50}$ est marqué <i>non atteint</i> (n/a). . . . .	67
3.1	Souches présélectionnées pour le projet Phy4FUN provenant de la collection du FIRI [183] . . . . .	89



# Introduction

It isn't what we say or think that  
defines us, but what we do

---

*Sense and Sensibility, 1811*  
Jane Austen

Dans ce chapitre, je présente de manière introductive et personnelle mon parcours, mes choix et orientations scientifiques, afin de permettre au lecteur de comprendre mon profil. Le chapitre suivant (Chap.1 : Titres et parcours académique) de ce document rassemble mon parcours académique, une liste des publications, les activités d'encadrements, mon implication dans des projets financés et la participation à des responsabilités collectives. Le chapitre suivant (Chap.2 : Bilan des travaux de recherches) fait état des réalisations scientifiques les plus importantes permettant de conduire au troisième chapitre (Chap.3 : Analyse prospective des activités de recherches qui propose quelques axes de travail. Enfin, je conclurai ce manuscrit en dernier chapitre.

## Parcours académique à Toulon

J'ai suivi des études de physique et chimie générale (DEUG) à l'université de Toulon et du Var. J'ai ensuite poursuivi en Licence et Maîtrise vers un cursus spécialisé autour de l'océan et l'atmosphère, ancré sur des concepts de mécanique des fluides, thermodynamique et mathématiques pour comprendre le comportement des fluides géophysiques où la force de Coriolis prévaut tel que le phénomène de transport d'Ekman sur les masses d'eau océaniques. Pour illustrer ce phénomène, je décris ci-dessous une application au dit transport d'Ekman qui m'a fortement intéressée car elle implique une échelle qui dépasse la simple théorie rotationnelle d'un écoulement géophysique :

La productivité océanique est principalement élevée à proximité des côtes, où les fleuves et le ruissellement apportent des sels minéraux issus des continents, ainsi que dans certains contextes spécifiques, tels que les *upwellings*. Les *upwellings* sont des zones où des eaux profondes, riches en nutriments, remontent à la surface (voir figure 1). Ces phénomènes se produisent notamment lorsque les vents dominants soufflent parallèlement à une côte. Ces vents exercent une force de friction sur la surface de la mer. Les effets de Coriolis tendent à déplacer la couche d'eau superficielle à 90° par rapport à la direction des vents, soit vers la gauche dans l'hémisphère sud, et vers la droite dans l'hémisphère nord. Au large du Pérou, l'eau superficielle est ainsi déviée vers le sud-ouest, vers le large, perpendiculairement à la côte. Avec le principe de conservation de la masse pour un fluide incompressible ( $\vec{\nabla} \cdot (\vec{U}) = 0$ , avec  $U$  la vitesse d'une particule de fluide), cette eau de surface, déplacée vers le large, est remplacée par des eaux profondes riches en nutriments, ce qui explique la richesse de ces eaux superficielles en phytoplancton et de tous les organismes de la chaîne alimentaire dépendant du phytoplancton (zooplancton, poissons, oiseaux marins, pinnipèdes... et aussi pêcheurs péruviens). Tous ces êtres vivants produisent des excréments et finissent par mourir. Les excréments déposés sur terre (notamment sur les îles côtières) par les oiseaux se transforment en *guano*[1]. Ainsi, par une analyse systémique, la compréhension d'un mécanisme hydrodynamique tend à compléter

l'analyse systémique du Pérou, de la météorologie à son économie.

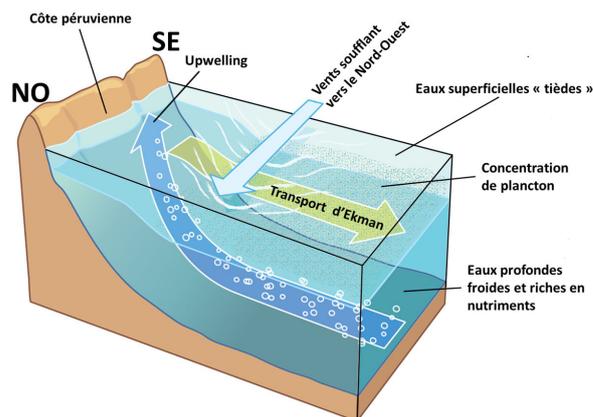


FIGURE 1 – Relations géométriques entre la côte péruvienne, la direction des alizés, et des mouvements d'eau induits : transport d'Ekman et *upwelling*. D'après Encyclopedia Britannica

## Master et Doctorat à Grenoble

C'est en Master 2 Recherche en *Rhéologie, Mécanique et Physique de la Matière en Écoulement* à l'École nationale de mécanique et d'hydraulique de Grenoble, adossé au Laboratoire de Rhéologie à Grenoble, que je me suis intéressé aux échelles mésoscopiques. J'ai eu l'occasion d'expérimenter en stage de M2 Recherche un rhéomètre basé sur le *test d'affaissement* ou le *consistomètre avancé* sous la direction de Jean-Michel Piau. C'est une méthode empirique permettant d'évaluer la consistance d'un échantillon de béton. A ce titre, nous proposons de décrire ce test par des lois de comportement de fluides Newtoniens puis complexes (viscoplastique dans le cas du béton). Cette méthode développée durant ce stage consiste à suivre en temps réel – par vidéo – le front de déplacement d'un matériau lorsque le contenant est retourné puis retiré sur une planche et en déduire directement les lois de comportements intrinsèques au matériau testé [2]. Je ne développerai pas ce volet dans ce manuscrit, mais on peut néanmoins retenir les aspects expérimentaux et conceptuels liés à la rhéométrie, qui alimenteront mon profil de chercheur à mon entrée à l'INRAE.

Suite à cette expérience, j'ai eu l'opportunité de suivre une thèse financée par une bourse ministérielle dans le même laboratoire sous la direction de Frédéric Pignon et Jean-Michel Piau aux échelles microscopiques. Le sujet s'oriente sur l'adhésion de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur le verre à l'échelle de la cellule individuelle par micromanipulation en pince optique. Ce travail a été effectué en collaboration avec Muriel Mercier-Bonin et Philippe Schmitz au Laboratoire de Biotechnologie et Bioprocédés à Toulouse (LBB qui deviendra le LISBP en 2005 puis TBI en 2019).

## Séjour postdoctoral à Umeå

J'ai ensuite rejoint l'équipe de recherche d'Erik Fällman, Magnus Andersson et Ove Axner au laboratoire de Physique à Umeå en Suède. Cette équipe a contribué significativement à une meilleure compréhension de la physique et la dynamique de dépliement/repliement de pili<sup>1</sup> chez *Escherichia coli* lorsqu'ils sont étirés par pince optique. J'ai pu développer différents

1. le terme *pili* sera souvent rencontré dans ce manuscrit. Le pilus est une protéine filiforme sécrétée par le microorganisme à sa surface. On distinguera ici les pili exprimés par les bactéries à Gram positif et ceux à Gram négatif. Ils sont impliqués dans l'adhésion aux surfaces ou inter-individus. Au pluriel *pili* et singulier *pilus*

concepts biophysiques dans un environnement très propice à la collaboration pendant presque trois ans.

Durant mon séjour postdoctoral, au rythme des hivers sans soleil et des étés sans nuits, j'ai également eu l'opportunité d'encadrer des étudiants :

**Jeanna Klinth** (de nationalité russe), chercheur postdoctoral dont le travail consistait en l'étude de molécules permettant de s'intercaler entre les sous-unités de la structure du pilus lors de son étirement et empêcher son repliement ; l'objectif était de proposer des alternatives aux antibiotiques en privant le pathogène de ses facultés adhésives.

**Efstratios Koutris** (de nationalité grecque), étudiant en thèse dont le projet se focalisait sur la biophysique/nanomécanique des pili de *Streptococcus pneumoniae* (collaboration avec Birgitta Henriques Normark – Stockholm) et *Streptococcus pyogenes* (collaboration avec Emmanuelle Charpentier - Prix Nobel de Chimie 2021). Efstratios a malheureusement abandonné à mi-parcours<sup>2</sup>, lui permettant d'obtenir néanmoins son diplôme (typiquement scandinave) *Licentiat*.

**Sarah Ehlers** (de nationalité allemande), étudiante en Master, lui a été confié le projet relatif aux pili de type F1C exprimés par une souche de laboratoire de *E.coli* (en collaboration avec Bernt Eric Uhlin du laboratoire de biologie moléculaire à l'université d'Umeå).

**Johan et Daniel Zakrisson** (de nationalité suédoise). Leur projet consistait à optimiser l'instrumentation de pince optique vers un dispositif compact présentant de faibles aberrations optiques. Johan était en charge de la partie construction et design du banc optique, tandis que Daniel s'occupait de la partie détection et bruit de mesure. Nous avons pu ainsi produire un dispositif très performant qui a été publié plus tard sur des applications biologiques.

## Chargé de Recherche à l'INRA à Toulouse

Fin 2010, j'ai intégré l'équipe *Génie du Métabolisme des Procaryotes* du LISBP à Toulouse et animée par Pascal Loubière. J'ai proposé une **approche biophysique sur la compréhension des mécanismes aliment/flore microbienne/mucus intestinal avec une application aux bactéries lactiques**. J'ai ainsi développé différents outils et méthodologies pour caractériser le mucus intestinal par (micro-)rhéométrie et suivi de traceurs, déterminer la nanomécanique de pili de lactocoques au moyen d'une pince optique et sonder le mucus produit *in vitro* par des lignées cellulaires muco-sécrétrices en créant un laboratoire L2 de culture cellulaire. En 2013, à la demande du département CEPIA j'ai dû cesser l'activité autour du microbiote / mucus intestinal. Tous les développements liés au montage du laboratoire L2 et à la méthodologie de lignées mucipares ont été arrêtés et n'ont pas pu être valorisés. J'ai intégré ensuite l'équipe *Transfert-Interface-Mélange* (TIM) du LISPB (actuel TBI) et proposé une thématique scientifique autour de **l'adhésion microbienne, plus spécifiquement sur la compréhension des phénomènes biologiques physiques et physico-chimiques qui interviennent dans la formation d'un biofilm**. Deux grands axes en découlent : **(i)** étude du rôle des protéines de surface dans la structuration d'un biofilm (projet *Pil2Film* et la thèse d'Ibrahima Dramé (en co-direction avec Christine Lafforgue) et **(ii)** exploration de solutions anti-encrassement avec la thèse de Zibin Nan en co-direction avec Didier Combes.

Dans le but de fédérer les compétences et forces de l'équipe TIM, j'ai amorcé en 2022 une réflexion stratégique sur le développement d'une méthodologie et d'outils génériques visant à identifier et comprendre les limitations aux transferts de réactions biologiques. Ces approches expérimentales et numériques tendent à identifier des mécanismes de réponse adaptative à l'échelle de la cellule unique au sein du bioréacteur en intégrant les problématiques d'hétérogénéités et engager un nombre suffisamment statistique pour des mesures individuelles.

2. Les thèses en Suède se déroulent sur cinq ans

## INTRODUCTION

Enfin, depuis 2020, j'assume la direction de l'équipe TIM avec Nicolas Dietrich (PR INSA), et la direction pleine depuis juillet 2024.

Ce document, visant à présenter l'habilitation à diriger les recherches s'articulera comme suit : je présenterai dans un premier chapitre administratif incluant la liste de mes productions scientifiques, d'activités d'enseignement et d'encadrement ; dans un second chapitre je proposerai une synthèse de mes activités scientifiques depuis le Master et enfin j'ouvrirai vers des perspectives à la fois en continuité avec mes activités et en rupture en proposant une nouvelle trajectoire.

# Chapitre 1

## Titres et parcours académique

### 1.1 Etat civil

Mickaël CASTELAIN, 44 ans

Nationalité Française

Marié, 5 enfants nés en 2005♀, 2007♂, 2009♀, 2011♀♀.

### 1.2 Formation universitaire

#### 2007 - DOCTORAT Rhéologie, Mécanique et Physique des Matériaux Fluides

Institut National Polytechnique de Grenoble, Grenoble, France.

Thèse intitulée « **Rhéologie Micronique : Adhésion de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur le verre** » encadrée par Frédéric Pignon and Jean-Michel Piau au Laboratoire de Rhéologie de Grenoble. Soutenue le 8 Novembre 2007 à Grenoble.

#### 2004 - MASTER 2 Rhéologie, Mécanique et Physique des Milieux Fluides

École Doctorale Mécanique et Énergétiques. Institut National Polytechnique de Grenoble, France.

#### 2003 - MASTER 1 et LICENCE Physique Mention Appliquée Océan-Atmosphère

Université de Toulon et du Var, Toulon, France.

#### 2001 - DIPLÔME D'ENSEIGNEMENT UNIVERSITAIRE GÉNÉRAL de Sciences de la Matière, option Physique-Chimie

Université de Toulon et du Var, Toulon, France.

### 1.3 Parcours professionnel

#### 1.3.1 [2008-2010] : Post-doctorat

Department of Physics, Umeå University, Umeå, Sweden

— 2008-2009 : Financement *Fondation Pour la Recherche Médicale*

— 2009-2010 : Financement *Faculty of Sciences*

### 1.3.2 [2010 - 2024] : Chargé de recherche classe normale

INRAe Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement,

TRANSFORM Aliments, produits biosourcés et déchets,

INSA Institut National des Sciences Appliquées (tutelle hébergeante)

TBI Toulouse Biotechnology Institute, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France

## 1.4 Activités d'enseignement

Qualifié Maître de Conférences :

- Section 30 : Milieux Dilués et Optique, 26/01/2010, 10230205040,
- Section 28 : Matériaux et Milieux Denses, 03/02/2010, 10228205040.

Activités :

- 2010 : Workshop "Microscopy in Microbial Systems" pour doctorants / Umeå , Suède : 12h
- 2011 : Formation continue INSA « Biofilms : enjeux et maitrise » : 4h
  - Techniques avancées de microscopie
  - Physico-chimie des surfaces et interfaces
- 2016 : Projet tutoré Semestre de transition 4A INSA : 10h
- 2017 : Projet tutoré Semestre de transition 4A INSA : 10h
- 2023 : Projet Initiation Recherche de 5A INSA : 15h
- 2024 : Projet Initiation Recherche de 5A INSA : 15h

## 1.5 Encadrement

### 1.5.1 Thèses soutenues

**Efstratios KOUTRIS** Fev. 2008 – Dec. 2010

**Biophysical studies of attachment organelles by optical micromanipulation techniques**

Thèse de doctorat de l'Université d'Umeå (UmU)

**Financement** : Université d'Umeå

**Responsabilité** : co-direction Ove Axner et Magnus Andersson (UmU)

Ce projet de thèse s'est essentiellement centré sur la caractérisation nanomécanique de pili exprimés par *Streptococcus pneumoniae*. Il a pu être observé que le comportement biomécanique de ce type de pili était très différents de ceux exprimés par *E.coli*. En effet, les pili de bactéries à Gram positif mettent en œuvre une machinerie de production différente, impliquant des enzymes d'assemblages, appelées les sortases. Ce résultat a pu être confirmé sur les pili de *Streptococcus pyogenes* ainsi que sur *Lactococcus lactis* (voir article [A11](#)).

**Travaux associés** : [A4](#), [A12-13](#), [A13](#), [C5-8](#), [P1-2](#).

**Thi-Ly TRAN**, Nov. 2010 – Déc. 2013

**Unraveling the muco-adhesion of *Lactococcus lactis* : development of biophysical approaches**

Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Financement** : Université des Sciences et Technologies d'Hanoi

**Responsabilité** : co-direction Muriel Mercier-Bonin (LISBP)

Le travail de Thi-Ly illustre une partie du projet de CR2 initial. Il se focalise sur la caractérisation des propriétés d'adhésion / interaction de bactéries lactiques, ici *Lactococcus lactis*

en prenant en compte les propriétés du mucus intestinal. Un premier volet de cette thèse a permis de démontrer les fortes capacités d'adhésion des souches sur les mucines – glycoprotéines majoritaires du mucus – lorsque les microorganismes étaient soumis à un écoulement cisaillé. Les principales molécules impliquées dans ce phénotype sont les pili et les protéines *Mub* (Mucus-binding). Les propriétés d'interaction du mucus ont ensuite été évaluées en caractérisant la mobilité / diffusion de particules aux propriétés de surface contrôlées (espèce chimiques, pH, charge); ceci a démontré que le mucus est un filtre sélectif par taille mais surtout par interaction. Mon implication dans l'encadrement cette thèse a été significative.

**Travaux associés :** A9, C9-10,15, P3.

**Zibin NAN, oct. 2017 – juin 2021**

**Pour la lutte contre les bioalissures : exploration de nouvelles surfaces anti-adhésives et bioactives**

Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Financement :** Chinese Scholarship Council

**Responsabilité :** co-direction Didier Combes (TBI)

Ce projet de thèse est à mon initiative et explore de nouveaux axes dans la compréhension des mécanismes de biofouling. Le biofouling est le procédé de colonisation d'une surface par des entités vivantes, micro- puis macroscopique. Le meilleur exemple à citer est la coque d'un bateau. Il subit un encrassement en trois phases principales : (i) sa contamination (ou conditionnement) lors de son immersion. Cette contamination est organique (ADN, protéines, sels, sucres etc.); (ii) l'adhésion de microorganismes (iii) la colonisation de macroorganismes (coquillages, mollusques, algues etc.). Ce projet de thèse repose sur l'hypothèse que le contrôle de la contamination initiale influe à terme sur son encrassement ou non. Plusieurs stratégies de modification de surface ont été proposées : inclusion de nanoparticules, dépôt de film mince polymère et immobilisation d'enzymes (protéases). Ce travail a bénéficié d'une collaboration en *Science des Matériaux* avec Claire Tendero (CIRIMAT, Toulouse) et Martina Baum (Université de Kiel, Allemagne).

**Travaux associés :** A17, A19-21, C19-20.

**Ibrahima DRAME Oct. 2017 – Mars 2021**

**Étude du rôle des pili de *Lactococcus lactis* dans la structuration d'un biofilm : approche biophysique multi-échelle**

Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Financement :** MESRI – bourse ministérielle

**Responsabilité :** co-direction Christine Lafforgue (TBI)

Ce projet de thèse dont je suis l'initiateur s'inscrit dans une démarche de continuité des travaux sur les pili de *Lactococcus lactis* entre mes activités liées au mucus intestinal dans l'équipe *Génie du Métabolisme des Procaryotes* et mon intégration dans l'équipe *Transfert-Interface-Mélange* sur les problématiques du biofilm (du conditionnement de surface au biofilm). Ce projet sera décrit plus en détail dans le prochain chapitre faisant état du bilan de mes travaux. En résumé, le biofilm de *L. lactis* exprimant des pili est fortement réticulé (structure très aérée) tandis que les souches dénuées de pili forment un film compact. Avec ce constat, une étude biomécanique au moyen de la pince optique sur des pili individuels a démontré des propriétés flexibles mais inextensibles de ces structures protéiques (article A11) mais aussi sur les capacités d'adhésion de ces souches sous écoulement (article A10). Pour mener plus loin notre compréhension de cette structuration de biofilm, ce projet de thèse s'intéresse aux interactions entre deux bactéries – brique élémentaire d'un collectif – au moyen de la microscopie à force atomique (collaboration Etienne Dague, LAAS) puis aux interactions lorsque le biofilm est établi donnant des informations sur la cohésion entre les microorganismes, dont les pili sont les principaux médiateurs.

**Travaux associés :** A16, A18, C18, C21, P9, P13-19.

### 1.5.2 Thèses en cours

**Alexis BAGES Avril 2022 – Avril 2025**

**Étude d'une nouvelle technologie de formulation en milieu solide lipidique hydrophobe destinée à la protection de biomolécules à usage thérapeutique**

Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Financement** : ANRT – convention CIFRE

**Responsabilité** : co-direction Nicolas DIETRICH (TBI)

L'insuffisance pancréatique exocrine (IPE), induite par des pathologies telles que la mucoviscidose, la pancréatite chronique et la maladie de Crohn, est un trouble gastro-intestinal souvent négligé et sous-diagnostiqué. Elle se traduit par une digestion intestinale inadéquate due à une sécrétion insuffisante de suc pancréatique, ce qui entraîne une gêne, des douleurs et, à terme, une malnutrition sévère. Bien que de nombreux traitements se soient révélés inefficaces au cours des trois dernières décennies, cette étude propose une formulation de lipides solides strictement hydrophobes, administrée par voie orale, pour restaurer la fonction digestive. Cette technologie s'appuie sur la nature hydrophobe de la matrice pour protéger physiquement le principe actif hydrophile de l'environnement gastrique tout en permettant sa libération immédiate dans le duodénum en ciblant la nature amphiphile des sels biliaires. Les résultats démontrent que cette formulation protège efficacement un principe actif sensible à l'acide pendant le passage gastrique (liquide gastrique simulé ou SGF), facilitant sa libération rapide lorsqu'il pénètre dans un environnement duodéal artificiel (liquide intestinal simulé ou SIF). En outre, il a été démontré que la préservation d'un principe actif à base de protéines va au-delà de sa structure protéique primaire pour inclure ses aspects fonctionnels, tels que l'activité enzymatique. Cette technologie d'administration de médicaments pourrait permettre de protéger les biomolécules actives hydrophiles, telles que la pancréatine, qui sont sensibles à l'acidité gastrique, tout en favorisant leur libération immédiate en cas de contact avec le liquide intestinal simulé. Ce projet de thèse est en partenariat avec la société ENEAPHARM et le CRITT Bio ne sera pas plus étayé dans ce document.

**Travaux associés** : A20, P19

**Kevin DEMONT Oct 2023 – Oct 2026**

**Accumulation de particules biologiques sur un support filtrant : étude dynamique et analyse morphologique**

Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Financement** : MESRI – bourse ministérielle

**Responsabilité** : co-direction Philippe SCHMITZ (TBI)

Disposer d'outils de simulations prédictifs de procédés pour limiter le recours à des campagnes d'essais coûteuses reste une priorité du secteur industriel, notamment pour les opérations de filtration. Une des clés dans le développement de tels outils est la modélisation du colmatage et en particulier de la formation et des propriétés de transfert des dépôts de matière en suspension qui s'accumulent nécessairement sur le filtre. Les caractéristiques morphologiques des dépôts dépendent de nombreux paramètres tels que la nature et la géométrie du filtre, les caractéristiques de la suspension et les conditions opératoires. Même si le colmatage d'un filtre est étudié depuis de nombreuses années et qu'il est possible dans une certaine mesure de le modéliser, certaines questions scientifiques restent en suspens, notamment lorsqu'il s'agit de filtrer des suspensions biologiques. Quel est l'impact : (i) de la forme de la cellule, (ii) des interactions de surface cellule / cellule et cellule /support, (iii) de l'état physiologique de la biomasse, (iv) des propriétés physico-mécaniques des particules biologiques, (v) de leur excrétion, sur la morphologie et les propriétés de transfert des dépôts de filtration formés. L'objectif principal de cette thèse est de concevoir et mettre en œuvre des expériences à petite échelle, une ou quelques particules à proximité d'une paroi solide et/ou filtrante, pour mieux comprendre la dynamique d'adhésion / détachement qui conduit à la formation d'un dépôt. Il s'agira aussi d'en caractériser la morphologie et les propriétés de transfert. Les modèles

biologiques choisis sont la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme référence de la littérature.. Ce travail s'appuiera sur des travaux de thèse récents réalisés au sein de l'équipe TIM de TBI qui mettaient en œuvre des outils expérimentaux originaux : chambre à écoulement cisailé, pince optique, AFM, chambre de filtration miniaturisée, microscopie optique et microscopie confocale. Je m'associe à ce projet de thèse au cœur des activités de Philippe Schmitz. J'apporte ici mes compétences en optique/microscopie. Ce sujet permet néanmoins d'alimenter mon intérêt sur les interactions, notamment entre les cellules (ici levures et bacilles) et avec la surface d'intérêt. Cette thèse a débuté en octobre 2023.

**Thao Anh NGUYEN Oct 2023 – Oct 2026**

**Compréhension de l'impact des déterminants morfo-physiques de champignons filamenteux et de leur secrétome cellulolytique dans la dégradation de co-produits agro-industriels par des approches de la cellule unique au bioréacteur**

Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

**Financement** : Bourse d'Excellence – Ambassade de France au Viet-Nam

**Responsabilité** : direction 100% / co-encadrement Tuan Anh Pham (SBFT)

Cette thèse peut illustrer le virage thématique lié au projet de recherche à venir ou tout du moins la diversification de mes activités vers la question scientifique suivante (détaillée en chapitre 3) : **Quel est le comportement d'un microorganisme sur le plan morfo-physique lorsqu'il est soumis à des environnements fluctuants?** Je mets à profit ici mes compétences pour la capture de cellule unique, dans des environnements microfluidiques. Suite au dépôt d'un projet (non retenu) ANR fédérant une majorité des compétences de l'équipe TIM, j'amorce une démarche mécanistique du bioréacteur. Ce projet de thèse est une application à cette question scientifique et se focalise sur la dégradation (ou valorisation) de déchets ligno-cellulosiques de l'agriculture à partir de souches naturelles de champignons filamenteux, en intégrant les échelles de la cellule unique au bioréacteur. Ce projet est en collaboration étroite avec le School of Biotechnology and Food Technology d'Hanoi (Vietnam) et la candidate a été sélectionnée par l'ambassade de France au Vietnam. Cette thèse a débuté en novembre 2023 et une dérogation à la diriger à titre individuel a été délivrée par l'Université de Toulouse en Juillet 2023.

### 1.5.3 Autres encadrements

Au cours des différents projets qui seront cités en section suivante, j'ai eu à encadrer 3 post-docs, 12 étudiants en Master 2 Recherche, 9 étudiants en Master 1, et 14 étudiants de niveaux inférieurs. Une liste exhaustive avec le projet de l'étudiant ainsi que la période est présentée ci-dessous :

#### Encadrement de postdoc

3 encadrements (supervision) de personnel en stage post-doctoral.

1. **KLINTH Jeanna** - 2009-2010

Umeå University

Investigations of small molecules targeting misfolding pili expressed by uropathogenic *E. coli*

2. **LEITNER Loïc** - 2014

LISBP - FERMaT

Suivi, capture et caractérisation de micro-organisme en écoulement microfluidique

3. **FORMOSA-DAGUE Cécile** - 2017/2019

LISBP-TBI

Enhancing flotation efficiency by functionalizing bubbles with algal cell wall constituents

**Encadrement d'étudiants Master 2 Recherche (6 mois)**

12 encadrements

4. **EHLERS Sarah** - 2009  
Umeå University  
Characterization of F1C pili expressed by uropathogenic *Escherichia coli*
5. **ZAKRISSON Johan** - 2010  
Umeå University  
Improvement of back-focal plane detection using diode lasers and He-Ne laser on optical tweezers (Part 1/2)
6. **ZAKRISSON Daniel** - 2010  
Umeå University  
Improvement of back-focal plane detection using diode lasers and He-Ne laser on optical tweezers (Part 2/2)
7. **PHILIPPE Cécile** - 2014  
LISBP  
Étude des capacités d'adhésion en conditions dynamiques de souches de *Lactococcus lactis* sur acier inoxydable
8. **GARCIA Guillermo** - 2015  
ERASMUS - LISBP - CIRIMAT  
Evaluation des propriétés antiadhésives du *Saccharomyces cerevisiae* sur une surface d'acier inoxydable AISI 316L
9. **DRAME Ibrahima** - 2016  
LGC - LISBP - EI Purpan  
Étude des conditions d'installation en biofilm de lactocoques : contrôle de la population de *Pseudomonas* dans la filière laitière
10. **AMMAR Meriem** - 2017  
LISBP - EI Purpan  
Capacité d'installation en biofilm de souches indigènes de *Lactococcus lactis*
11. **CHERRIER Amin** - 2017  
LISBP - CIRIMAT  
Revêtements antifouling : influence de la nature du matériau sur l'adhésion de microorganismes
12. **EILERTSEN BAY Lilli Teres** - 2017 & 2018  
LISBP-NTNU (Université Trondheim)  
Exploring the interaction capacities of microorganisms by the use of high-resolution experimental tools
13. **SOUEID Sarah** - 2023  
TBI - CIRIMAT  
The encapsulation of bacteria in porous media as a clogging control tool in membrane bioreactors
14. **RIZK Gaëlle** - 2024  
TBI - USJ (Liban)  
Caractérisation de l'adhésion et de la dynamique de colonisation des spores pour l'évaluation de *Bacillus thuringiensis* sous écoulement de cisaillement dans le développement de biopesticides durables
15. **COSTA Alick** - 2024  
TBI - EURBioEco  
Nutritive limitation of filamentous fungi inducing stress

**Encadrement d'étudiants Master 1 Recherche (2-3 mois)**

9 encadrements d'étudiants pour 8 projets de Master 1.

16. **TURNOCK Michael** - 2013  
LISBP - Loughborough University  
*In vitro* evaluation of the diffusion of *Lactococcus lactis* strains inside pig gastric mucin-based hydrogels using diffusion front tracking
17. **RAYME Mélanie** - 2013  
LISBP - EI Purpan  
Étude des caractéristiques physico- chimiques de surface de lactocoques isolés de lait de chèvre
18. **TAO Yanzhu** - 2018  
LISBP - CIRIMAT  
Revêtements antifouling : influence de la nature du matériau sur l'adhésion de micro-organismes
19. **CHEN Liuyi** - 2019  
LISBP - CIRIMAT  
Revêtements antifouling : influence de la nature du matériau sur l'adhésion de micro-organismes
20. **SOUCASSE Andréas** - 2021  
TBI - LAAS  
Étude des propriétés adhésives de différentes souches de *Candida glabrata*
21. **GUTIERREZ Amanda & HERRERA Noemi** - 2023  
TBI - EUR BioEco  
Morpho-granulometry analysis of complex formulations for biopesticide production & Morpho-granulometry as a method for studying *Bacillus thuringiensis* morphology
22. **MERODIO Aranzazu** - 2024  
TBI - EUR BioEco  
Integrating single-cell approach into bioreactor scale to understand the impact of morpho-physical determinants of filamentous fungi on cellulotic secretome production from agro-industrial by-products.
23. **GUTIERREZ Amanda** - 2024  
TBI - EUR BioEco  
Morpho-physical and mechanical characterization of the microorganisms involved in filtration processes.

**Autres encadrements**

Cette section fait état des encadrements d'étudiants en niveau inférieur au Master 1 pour des durées de une semaine (cas de élèves de 3<sup>e</sup>) à six semaines (BTS, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> année INSA/ENSIACET, Bac Pro etc.). Il s'agit ici de 19 étudiants encadrés impliqués dans 12 projets/sujets. Ces encadrements divers sont listés ci-dessous par ordre chronologique.

24. **BOUTIN Mathieu, DUBUS Marie, GUILHOU Mathieu** - 2015  
3A ENSIACET
25. **ENJALBERT Rémy** - 2016  
3<sup>ème</sup> au Collège
26. **MONTALEGRE Esteban** - 2016  
3<sup>ème</sup> au Collège
27. **MONNIER Nathan** - 2017  
Bac Pro *Chimie de l'eau*

28. **JANDEL Jeanne** - 2017  
BTS
29. **LAMY Célia** - 2017  
3<sup>ème</sup> au Collège
30. **ZHANG He** - 2018  
2A INSA
31. **CASTELAIN Héloïse** - 2018  
3<sup>ème</sup> au Collège
32. **CASTELAIN Arthur** - 2021  
3<sup>ème</sup> au Collège
33. **SELLAM Romain** - 2023  
3<sup>ème</sup> au Collège
34. **BERTI Lucas, GROSPIRON Léa, TACHEZ Nour** - 2023  
Projet Initiation Recherche INSA  
*Design of miniaturized shear flow chamber.*
35. **GONZALEZ Remy, PETIT Mathis, MAS Bastien, MARTER Nicolas** - 2024  
Projet Initiation Recherche INSA  
*Elucidating cake formation through micro-scale experiments and modelling.*

### Encadrements de personnels

6 Personnels techniques :

- Christophe ELLERO (T INSA, Mécanique 2020),
- Claude LE MEN (IR CNRS, Optique 2020-2021),
- Nathalie CLERGERIE (T INSA puis AI, Chimie – 2020-2024),
- Abdali KHALFAOUI (AI INSA puis IE, Mécanique 2020-2024),
- Guillaume CHAREYRE (IR CNRS Optique 2022-2023),
- Kilian ALEAU (IR CNRS, Optique, 2024-2025),
- Nicolas RICHARD (IE INSA, Génie Physique, 2024-2025).

## 1.6 Implication dans des projets financés

### 2009 / Carl Trygger foundation

*Studies of multipili-mediated bacterial adhesion by force measuring optical tweezers*

Au cours de mon séjour postdoctoral, j'ai contribué à l'obtention d'un financement lié aux projets que je conduisais sur le biomécanique de pili d'*E.coli*. Cette source de financements a permis d'acquérir du matériel pour optimiser l'instrumentation de pince optique (platine piezo-électrique 3D et contrôleurs associés). Ove Axner était le porteur principal. Montant total attribué : 240 kSEK (environ 21 k€ à ce jour).

### 2011 & 2012 / Action Nouvelle Soutenue

*Caractérisation des propriétés biomécaniques et muco-adhésives des pili de Lactococcus lactis par pince optique.*

Au lancement de mon activité de chargé de recherche, j'ai bénéficié du soutien de l'INRAe (département CEPIA) avec l'obtention d'une Action Nouvelle Soutenue – visant les projets exploratoires - essentiellement centrée sur le développement d'une instrumentation de pince optique. L'application scientifique permettait de caractériser les propriétés mécaniques de pili de *Lactococcus lactis*, à l'échelle de la molécule unique, ce qui encore n'avait jamais été fait. J'ai été le porteur du projet avec une collaboration de Jean-Christophe Piard (Institut MICALIS).

Montant total attribué : 30 k€ (15 k€ par an).

### 2011 / Bonus Qualité Recherche INSA

*Interaction Bactéries Lactiques / Mucus Intestinal : approche expérimentale et numérique*

Pour compléter le financement cité plus haut, l'INSA m'a également soutenu au travers d'un financement permettant d'investir des moyens sur la diffusion de particules dans le mucus intestinal. Ici encore, j'ai été le porteur en collaboration avec Philippe Poncet (Institut de Mathématiques à l'INSA Toulouse).

Montant total attribué : 14 k€

### 2013 / Toulouse Tech Interlabs (TTIL) LACTAD

*Capacités d'adhésion de lactocoques isolés du lait de chèvre et de formation de biofilms dans la machine à traire*

Le projet LACTAD, financé par le réseau Toulouse Tech Interlabs, consiste à caractériser les propriétés physico-chimiques de surfaces ainsi que les capacités d'adhésion de souches environnementales de *L. lactis* sur des supports caractéristiques de la machine à traire. Ce projet LACTAD, porté par l'école d'ingénieur de Purpan (EIP) et en collaboration avec le LISBP (équipe Transfert-Interface-Mélange (TIM) et Génie du Métabolisme des Procaryotes (GMP)) a pour objectif d'analyser les aptitudes de certaines souches de *L. lactis* à former des biofilms. Il nous a permis de valoriser différentes souches d'intérêt pour leurs capacités d'adhésion mais aussi leur propriétés anti-*Listeria*, qui est un atout majeur dans le milieu laitier et fromager. En effet, les biofilms dans les installations laitières jouent un rôle non négligeable dans la qualité des produits finis. Ils peuvent être à l'origine de défauts de qualité sanitaire et technologique. Dans la fabrication de fromages au lait cru, les biofilms sont cependant nécessaires. En effet, la microflore d'intérêt du lait cru est capable de s'installer en biofilm de la machine à traire au tank à lait jusqu'aux planches d'affinage et joue un rôle technologique important. J'ai été un membre très actif du projet, puisque toutes les expériences de caractérisation (physico-chimique et d'adhésion) ont été menées au LISBP, sous ma direction au travers de 4 stages.

Montant total attribué : 15 k€

### 2013 / TTIL AlgueFlo

*Étude locale des mécanismes de flottation de micro-algues par AFM et microfluidique*

Ce projet, en marge avec mes activités principales, a permis néanmoins de tisser des relations avec Pascal Guiraud autour de la question de la récolte des microalgues par flottation. Les micro-algues offrent un potentiel d'innovation pour les secteurs de l'énergie, de la chimie, de la nutrition humaine et animale et de la cosmétique de par leur richesse intrinsèque. L'un des principaux verrous liés à leur exploitation industrielle concerne la récolte de ces microalgues et la diminution de leur teneur en eau afin de limiter l'énergie mobilisée. Ces deux étapes doivent pouvoir être menées en garantissant l'intégrité des micro-organismes et, si possible, sans utiliser de produits chimiques qui pourraient être rejetés dans le milieu de culture recyclé, et/ou contaminer la pâte algale. Les nombreuses techniques de récolte de micro-algues existantes (centrifugation, sédimentation, floculation microbienne, ...) se trouvent naturellement hors du champ de l'état de l'art en regard des objectifs poursuivis ici. En revanche, la flottation apparaît comme un procédé potentiellement intéressant. Ce projet a pour objectif l'étude des mécanismes de flottation de la micro-algue *Dunaliella salina*. La flottation est un procédé qui utilise des bulles de gaz pour faire remonter une espèce à la surface et ainsi la concentrer. Par ce projet, j'ai proposé de caractériser les phénomènes d'interaction, ici d'adsorption d'une microalgue unique sur une bulle soit par Microscopie à Force Atomique soit par micro-fluidique en faisant rencontrer les deux entités. Ce projet a bénéficié du soutien local de la fédération FERMaT ([www.federation-fermat.fr/](http://www.federation-fermat.fr/)) avec un chercheur postdoctoral (Loïc Leitner) pour le développement de la plateforme microfluidique, embarquée dans le dispositif

de pince optique. J'ai été le porteur et l'initiateur de ce projet, en collaboration avec Pascal Guiraud et Philippe Tordjeman. Le montant alloué a permis de participer au financement d'un AFM à l'IMFT. Ce projet a permis de démontrer la faisabilité sur le couplage fluorescence - optique dans un environnement microfluidique. Cette thématique de « flottation de la cellule unique » s'est concrétisée par l'intégration dans l'équipe de Cécile Formosa-Dague qui est arrivée dans l'équipe en séjour postdoctoral puis en qualité de Chargée de Recherche CNRS sur cette thématique (Article A15).

Montant total attribué : 18 k€

### 2015 / TTIL Lactofilm

*Etude des conditions d'installation en biofilm de lactocoques : contrôle de la population de Pseudomonas*

Ce projet fait suite au projet LACTAD et consiste à suivre l'influence des lactocoques sélectionnés sur des flores d'altération telles que *Pseudomonas fluorescens*. Ce projet est porté par l'École d'Ingénieur de Purpan, en collaboration avec Christine Roques (Laboratoire de Génie Chimique) et le LISBP. Les *Pseudomonas* présents sur les fromages de chèvre vont amener un défaut de croûtage, un mauvais développement des flores d'affinage, un défaut de texture, de goût et une odeur désagréable du fromage après 2 à 8 jours d'affinage. La contamination par *Pseudomonas* spp. est essentiellement due à la présence d'une phase aqueuse. Ces bactéries s'installent ensuite en biofilm principalement dans la machine à traire. Les techniques de nettoyage permettent en partie de réduire ou maîtriser ces bactéries mais en contrepartie, les bactéries d'intérêt sont également impactées. Il s'agit donc pour les fromagers d'identifier des leviers d'action innovants afin de favoriser les lactocoques (flore d'intérêt) par rapport aux *Pseudomonas* (flore d'altérations). Un de ces leviers serait de former un biofilm positif de lactocoques et de maîtriser son installation/compétition par rapport à l'installation de *Pseudomonas* spp. Mon implication ici a été de conduire les expériences en chambre à écoulement cisaillé et en mesure de charge de surface. Tout le volet « biofilm » a été effectué au LGC avec Christine Roques.

Montant total attribué : 15 k€

### 2016 / TTIL Pil2Film

*Single-Molecule force spectroscopy to unveil the biofilm-forming properties of pili in L. lactis*

Ce projet s'inscrit dans la continuité des travaux menés depuis mon entrée à l'INRAe sur les pili de *L. lactis*. Après avoir démontré les capacités d'adhésion de ces souches, sous écoulement, ainsi que décrit les propriétés nanomécaniques sous contrainte, la suite a été de proposer une étude pour comprendre les mécanismes de structuration d'un biofilm réticulé et le rôle des pili dans ce phénomène. Ce projet a pu ensuite être alimenté par l'obtention d'une thèse (Ibrahima Dramé) en 2017. Ces résultats, dans leur ensemble (de 2014 à 2021) seront présentés en section 2.5 page 52. J'ai été l'initiateur et porteur du projet.

Montant total attribué : 18 k€

### 2016 / Programme Hubert Curien (PHC) Aurora et IDEX SMIRCH

*Force Spectroscopy and Optical Tweezers combined for Single Molecule Research at the Surface of Living Cells*

Ce projet visait à initier de nouvelles collaborations, ici avec le NTNU<sup>1</sup> à Trondheim en Norvège. La thématique principale consistait en l'étude des interactions d'une mycotoxine avec la paroi d'une levure, pour des applications agro-alimentaires (société Lallemand). J'ai contribué notamment à l'optimisation de l'instrumentation de pince optique au NTNU ainsi qu'au traitement des spectres de force. Cette thématique a également bénéficié de la visite d'une étudiante en Master 2 (Lilli Teres Eilertsen Bay) pour caractériser les propriétés d'adhésion / interaction de particules fonctionnalisées par la mycotoxine, sur des surfaces conditionnées,

---

1. NTNU : Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet <https://www.ntnu.no/>

sous écoulement cisailé. Ce projet a été porté par Etienne Dague (LAAS).

Montant total attribué :

- SMIRCH : 50 k€
- AURORA : financement mission 1 semaine à Trondheim (Février 2017) et accueil partenaires à Toulouse (Juin 2017).

## 2022 / Phy4Bio

*Mesures physiques pour la compréhension des bioprocédés*

Cette opportunité de financement pour la mobilité de personnels avait pour objectifs multiples : (i) le renforcement d'une collaboration forte de dix ans entre les deux instituts et (ii) la présentation des activités de TBI et de l'équipe TIM pour promouvoir de nouvelles activités. Cela a été l'occasion d'initier des vellétés de dépôts de projets de grandes envergures (EU), ainsi que rencontrer des candidats potentiels. J'ai ainsi bénéficié de cet instrument pour construire un projet de thèse, obtenu en mars 2023 (thèse de Mlle Thao Anh Nguyen, début octobre 2023). Ces aspects seront développés dans le chapitre 3 : Analyse prospective des activités de recherches.

Financement : une mission en décembre 2022 à Hanoi pour renforcer des collaborations.

## 1.7 Responsabilités collectives

### 2014-2018 / Animation scientifique de l'équipe TIM

Durant la période 2014-2018, j'ai été l'animateur des séminaires de l'équipe TIM. J'ai pu ainsi organiser environ 2 à 3 séminaires par mois, représentant 110 séminaires au total. L'objectif était de dynamiser le groupe en créant des espaces ritualisés d'échanges, principalement autour de projets en cours via l'avancement des travaux des étudiants, mais aussi en invitant des personnalités extérieures. Le créneau dédié au séminaire était couplé avec celui de la réunion d'équipe, j'étais donc impliqué à l'organisation des réunions.

### 2018-2022 / Pilote processus « Réalisation de projet » de la démarche qualité de l'unité

Sur la période d'avril 2018 à Mai 2022, j'ai pris la responsabilité du pilotage du processus qualité « Réalisation de Projets » avec Myriam Mercade (IR INSA) et Nathalie Vettori (AI CNRS, assistante de la direction TBI). L'unité TBI est certifiée ISO9001 depuis 2016 pour les activités suivantes : "Activités de recherche et développement en biotechnologie et procédés : biologie de synthèse, biologie systémique, génie des (bio)-procédés et bio-ingénierie et projets de recherche collaboratifs publics et privés".

Mes missions étaient (i) d'assurer la bonne conduite de la démarche qualité dans le cadre de la réalisation de projet, (ii) d'informer les correspondants qualité de toute modification, (iii) d'améliorer le processus pour le rendre plus efficace en prenant en compte les remarques notamment lors des audits, et (iv) de mettre en place un plan d'action et le suivre.

Depuis ma prise de fonction, nous avons participé à quatre audits internes (INRAe) et quatre audits de certification ou renouvellement. Une des réalisations notables est la mise en place d'un outil unique « IZILAB » qui regroupe tous les processus qualité (RH, finance, infrastructure et projets) dont nous avons été initiateurs et qui est à présent déployé dans l'unité. Cette démarche permet d'apporter une meilleure traçabilité des données et prend en compte de manière significative la gestion du risque et la fiabilité des mesures. La mécanique du processus est à présent opérationnelle et mature. Pour des raisons de priorités et de gestion du temps, j'ai fait le choix de cesser cette activité en Mai 2022.

### **2018-2024 / Correspondant laboratoire FERMaT**

Sur la période 2018-2024, j'ai assuré la correspondance du laboratoire pour la fédération de recherche FERMaT (FR 3089), dirigée actuellement par Pascal Guiraud. C'est une entité toulousaine comprenant environ 180 chercheurs et structurée autour de 9 laboratoires (LGC, CIRIMAT, IMFT, LAPLACE, LAAS, TBI, IMRCP, ICA et LMDC). La fédération a pour objectif central d'initier et de soutenir des projets de recherches interdisciplinaires dans le domaine des sciences pour l'ingénieur sur Toulouse et sa région. Ce soutien se concrétise par l'achat d'équipements lourds mis à la disposition des laboratoires FERMaT et de leurs partenaires universitaires ou industriels. FERMaT finance également un contrat postdoctoral chaque année sur des projets inter-laboratoires. La fédération est organisée autour de 5 thèmes de recherche auxquels peuvent participer les chercheurs de tous les laboratoires impliqués. Des réunions de thème sont organisées régulièrement (1-2 fois par an) pour confronter les idées et approches de chacun et discuter des projets communs. Depuis 2011, je participe aux thèmes « Ingénierie pour le Vivant » et « Microfluidique et Microréacteurs ». En tant que correspondant de laboratoire, j'assure la connexion entre TBI et FERMaT et le transfert des informations. J'assiste également aux conseils de la fédération (2 à 3 fois par an) et participe aux décisions collectives. Le budget de la Fédération est d'environ 100 k€/an, dont 5 à 10 k€ fléchés pour le thème.

### **Depuis 2020 / Responsable/animateur d'équipe**

Depuis Avril 2020, j'assume la co-direction/co-animation de l'équipe Transfert-Interface-Mélange (EAD7) avec Nicolas Dietrich (PR INSA), et depuis Juillet 2024 j'en ai la direction complète. Depuis la création de *Toulouse Biotechnology Institute* (TBI), en 2019; anciennement *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés* (LISBP), l'équipe TIM est incluse dans une structure regroupant 4 pôles dans l'unité, ici le pôle *Sustainable Chemical Engineering*.

L'équipe recense à ce jour 3 chercheurs INRAe (2 CR et 1 DR) TRANSFORM, 1 chercheur CNRS, 11 enseignants-chercheurs INSA (3 MCF et 8 PR) et 3 personnels ITA (1 AI INSA, 1 IE INSA et 1 IR CNRS en CDD) ainsi que 18 doctorants, 6 postdoctorants soit au total 41 personnels. L'équipe est structurée autour de 2 grands thèmes :

- Le comportement des particules aux interfaces avec la modélisation du transfert de fluides à travers des particules biologiques, la caractérisation des systèmes filtrants, la séparation de nanoparticules, les phénomènes d'agrégation et d'hétéro-coagulation et l'analyse des phénomènes d'adhésion
- Les phénomènes de transport et de transfert en bioréacteurs multiphasiques avec une expertise sur les mélanges, la caractérisation des populations de bulles et de gouttes, les transferts de matière gaz-liquide, la modélisation de bioréacteurs intégrant les interactions entre phénomènes physiques et biologiques

J'assure le suivi des personnels techniques, des finances, de l'animation scientifique (réunions de fonctionnement hebdomadaire & séminaires scientifiques deux fois par mois), participe au conseil scientifique du laboratoire, ainsi qu'à la future rédaction et présentation du rapport HCERES de l'équipe (prévu en 2025). Le budget de l'équipe est d'environ 500 k€ par an (350 k€ de salaire (doc et post-doc) et 150 k€ d'investissements/équipements et missions).

### **Depuis 2022 : Co-animateur du Groupe de Travail « Microfluidique » dans l'unité**

L'unité TBI souhaite promouvoir la transversalité depuis la mise en place de la nouvelle équipe de direction. Plusieurs mot clés émanant des chercheurs sont remontés dont le terme « Microfluidique ». Cela implique que plusieurs personnes sont intéressées pour utiliser /

développer l'outil dans leurs activités de recherche, ou du moins ont été utilisateurs par le passé. Un groupe de travail a été créé en 2022, dont Guillermina Hernandez-Raquet, Sophie Bozonnet et moi-même sommes les animateurs. Pour l'instant, notre mission est de faire rencontrer les personnes, présenter des projets passés ou en cours ayant attiré à la technique, puis commencer à croiser les idées de collaborations pour structurer le thème et aboutir au montage de projets fédérateurs.

### Membre de jury et comités de thèse

Je participe / j'ai participé à 12 comités de thèse (expert ou parrain de thèse). Je suis notamment fortement sollicité par l'ED MEGeP avec le dispositif « Parrain de thèse », devenu récemment Comité de Suivi Individuel (CSI) :

1. **BOUZABIA Yassim** - LISBP - soutenue 2017
2. **HASSAN Ali** - LGC - soutenue 2020
3. **GUETTE Simon** - LGC - soutenue 2021
4. **GUILLOU Julien** - IMFT - soutenue 2021
5. **BRIDONNEAU Louis** - ICA - soutenue 2022
6. **FAVRE Luc** - IMFT - soutenue 2022
7. **AZAR Patrick** - LMDC - soutenue 2023
8. **DECKER Thomas** - ISAE-ONERA-EDyF - 3A 2022
9. **JACQUOT Amaury** - IMT Mines-Albi - 2A 2022
10. **BEN GHORBAL Yasmine** - IMT Mines-Albi - 1A 2023
11. **BEN GHORBAL Yasmine** - IMT Mines-Albi - 2A 2024
12. **JACQUOT Amaury** - IMT Mines-Albi - 3A 2022

J'ai également pris part à 9 jurys de soutenance en qualité de rapporteur ou d'examineur.

13. **RAYME Mélanie** - EI Purpan - Master 1 - 2014
14. **TRAN Thi-Ly** - LISBP - Thèse - 2013
15. **LAROCHE Romain** - LGC - Master 2P - 2015
16. **SOUMBO Marvine** - LGC - Master 2P - 2015
17. **FUENTES Juan** - LAAS-CNRS - Master 2P - 2018
18. **DRAME Ibrahima** - TBI - Thèse - 2021
19. **NAN Zibin** - TBI - Thèse - 2021
20. **SOUEID Sarah** - TBI-CIRIMAT - Master 2P - 2023
21. **DUCAMP Arnaud** - LGC - Master 2P - 2024

## 1.8 Liste des travaux

Dans tous les projets d'articles auxquels j'ai participé, mon implication a été majeure pour le développement du concept, l'interprétation des résultats et la rédaction. Tous les articles reflètent et alimentent de près ou de loin ma question scientifique.

Les communications orales (25), les posters (19) et les séminaires (19) sont listés ci-dessous.

## 1.8.1 Publications internationales

- **A20 Hydrophobic solid lipid-based microparticles for the protection of enteric-sensitive hydrophilic active biomolecules for oral administration in the treatment of EPI**,  
Alexis Bages, Mickaël Castelain, Nicolas Dietrich, Rosanne Raynal, Karim Ioualalen.  
**European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2024, 204, 114504, 10.1016/j.ejpb.2024.114504 [3]
- **A19 Surface Conditioning Effects on Submerged Optical Sensors : A Comparative Study of Fused Silica, Titanium Dioxide, Aluminum Oxide, and Parylene C**  
Zibin Nan, Pascal Floquet, Didier Combes, Claire Tendero, Mickaël Castelain.  
**Sensors**, 2023, 23 (23), pp.9546, <10.3390/S23239546>.  
<https://cnrs.hal.science/hal-04350817>
- **A18 Pili and other surface proteins influence the structure and the nano-mechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms.**  
Ibrahima Dramé, Christine Lafforgue, Cécile Formosa-Dague, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Jean-Christophe Piard, Mickaël Castelain et Etienne Dague  
**Scientific Reports**, 2021, 11 (1), <10.1038/s41598-021-84030-1>.  
<https://hal.laas.fr/hal-03163203>
- **A17 Development of Polythiourethane/ ZnO-Based Anti-Fouling Materials and Evaluation of the Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida glabrata* Using Single-Cell Force Spectroscopy.**  
Sophie Klemm, Martina Baum, Haoyi Qiu, Zibin Nan, Mafalda Cavalheiro, Miguel Cachinho Teixeira, Claire Tendero, Anna Gapeeva, Rainer Adelung, Etienne Dague, Mickaël Castelain et Cécile Formosa-Dague.  
**Nanomaterials** 2021, 11, 271. //doi.org/10.3390/nano 11020271  
<https://hal.inrae.fr/hal-03136104v1>
- **A16 Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using Single-Cell Force Spectroscopy.**  
Ibrahima Dramé, Cécile Formosa-Dague, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Jean-Christophe Piard, Mickaël Castelain, et Etienne Dague  
**ACS Applied Materials and Interfaces**, 12(19) :21411– 21423, May 2020. doi : 10.1021/acsami.0c03069.  
<https://hal.inrae.fr/hal-02860018>
- **A15 Towards a better understanding of the flocculation/flotation mechanism of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* under increased pH using atomic force microscopy,**  
Cécile Formosa-Dague, Vincent Gernigon, Mickaël Castelain, Fayza Daboussi, et Pascal Guiraud,  
**Algal Research - Biomass, Biofuels and Bioproducts**, 33 :369–378, July 2018a. doi : 10.1016/j.algal.2018.06.010.  
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01886487>
- **A14 The Role of Glycans in Bacterial Adhesion to Mucosal Surfaces : How Can Single- Molecule Techniques Advance Our Understanding ?**,  
Cécile Formosa-Dague, Mickaël Castelain, Hélène Martin-Yken, Karen Dunker, Etienne Dague et Marit Sletmoen,

**Microorganisms**, 6(2) :26 p., June 2018b. doi : 10.3390/microorganisms6020039.  
<https://hal.inrae.fr/hal-01886492>

- **A11 The nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* pili are conditioned by the polymerized backbone pilin**,  
 Mickaël Castelain, Marie-Pierre Duviau, Alexis Canette, Philippe Schmitz, Pascal Loubière, Muriel Cocaïgn Bousquet, Jean-Christophe Piard et Muriel Mercier Bonin,  
**PLoS ONE**, 11(3) :np, 2016a. doi : 10.1371/journal.pone.0152053.  
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01886384>
  
- **A10 Oligomerized backbone pilin helps piliated *Lactococcus lactis* to withstand shear flow**,  
 Mickaël Castelain, Marie-Pierre Duviau, Virginie Oxaran, Philippe Schmitz, Muriel Bousquet, Pascal Loubière, Jean-Christophe Piard et Muriel Mercier-Bonin,  
**Biofouling**, 32(8) :911–923, 2016b. doi : 10.1080/08927014.2016.1213817.  
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01533909>
  
- **A9 Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in mucoadhesion of *Lactococcus lactis***,  
 Doan Le, Thi-Ly Tran, Marie-Pierre Duviau, Mickael Meyrand, Yann Guerardel, Mickaël Castelain, Pascal Loubière, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Etienne Dague et Muriel Mercier-Bonin,  
**PLoS ONE**, 8(11) :np, 2013. doi : 10.1371/journal.pone.0079850  
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01204286>
  
- **A8 Single-cell adhesion probed in-situ using optical tweezers : A case study with *Saccharomyces cerevisiae***,  
 Mickaël Castelain, Paul G. Rouxhet, Frédéric Pignon, Albert Magnin, and Jean-Michel Piau,  
**Journal of Applied Physics**, 111(11), 2012. doi : 10.1063/1.4723566.  
<https://hal.inrae.fr/hal-02652364>
  
- **A7 The influence of pH on the specific adhesion of P piliated *Escherichia coli***.  
 Jeanna E Klinth, Mickaël Castelain, Bernt Eric Uhlin, and Ove Axner,  
**PLoS ONE**, 7(6) :e38548, 2012. doi : 10.1371/journal.pone.0038548  
<https://hal.inrae.fr/hal-02648549>
  
- **A6 Fast uncoiling kinetics of F1C pili expressed by uropathogenic *Escherichia coli* are revealed on a single pilus level using force-measuring optical tweezers**  
 Mickaël Castelain, Sarah Ehlers, Jeanna Klinth, Stina Lindberg, Magnus Andersson, Bernt Eric Uhlin, and Ove Axner.  
**European Biophysics Journal**, 40(3) :305–316, 2011. doi : 10.1007/s00249-010-0648-1. <https://hal.inrae.fr/hal-02644269>
  
- **A5 Unfolding and refolding properties of S pili on extraintestinal pathogenic *Escherichia coli***,  
 Mickaël Castelain, Annita E. Sjöstrom, Erik Fällman, Bernt Eric Uhlin, and Magnus Andersson  
**European Biophysics Journal**, 39(8) :1105–1115, 2010. doi : 10.1007/s00249-009-0552-8.

<https://hal.inrae.fr/hal-02659055>

- **A4** **Characterization of the biomechanical properties of T4 pili expressed by *Streptococcus pneumoniae* - a comparison between helix-like and open coil-like pili,**  
Mickaël Castelain, Efstratios Koutris, Magnus Andersson, Krister Wiklund, Oscar Björnham, Staffan Schedin, and Ove Axner.  
**ChemPhysChem**, 10(9-10) :1533–1540, 2009. doi : 10.1002/cphc.200900195.  
<https://hal.inrae.fr/hal-02660562>
- **A3** **The initial single yeast cell adhesion on glass via optical trapping and Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek predictions,**  
Mickaël Castelain, Frédéric Pignon, Jean-Michel Piau, and Albert Magnin,  
**Journal of Chemical Physics**, 128(13) :135101, 2008. doi : 10.1063/1.2842078.  
<https://hal.inrae.fr/hal-02658357>
- **A1** **Removal forces and adhesion properties of *Saccharomyces cerevisiae* on glass substrates probed by optical tweezer,**  
Mickaël Castelain, Frédéric Pignon, Jean-Michel Piau, Albert Magnin, Muriel Mercier-Bonin, and Philippe Schmitz  
**Journal of Chemical Physics**, (127) :135104, 2007. doi : 10.1063/1.2772270.  
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00342008>

### 1.8.2 Manuscrits à soumettre ou soumis

- **A21** **A Protease Surface Functionalization Prevents From The Early Stages of Biofouling,**  
Zibin Nan, Claire Tendero, Philippe Schmitz, Didier Combes, Mickaël Castelain.  
*Soumission prévue dans la revue **Surfaces***
- **A22** **Anti-biofilm properties of novel PTU/ZnO-based surfaces under shear-stress flow for biomedical, food and marine applications.**  
*En préparation*

### 1.8.3 Publications nationales

- **A2** **Propriétés d’adhésion de levures sur le verre, sondées par pince optique. Influence de paramètres environnementaux,**  
Mickaël Castelain, Frédéric Pignon, Jean-Michel Piau, and Albert Magnin,  
**Rhéologie**, 12 :37–44, 2007,  
<https://hal.inrae.fr/hal-02658427>

### 1.8.4 Chapitres d’ouvrage

- **A13** **Assessing bacterial adhesion on an individual adhesin and single pili level using optical tweezers,**  
Ove Axner, Magnus Andersson, Oscar Björnham, Mickaël Castelain, Jeanna Klinth, Efstratios Koutris, and Staffan Schedin,  
*In **Bacterial adhesion : Chemistry, biology and physics***, volume 715 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, page 374 p. Springer Science - Business Media B.V., 2011. doi : 10.1007/978-94-007-0940-9\_19  
<https://hal.inrae.fr/hal-02809687>

- **A12 Unraveling the secrets of bacterial adhesion organelles using single-molecule force spectroscopy**,  
Ove Axner, Oscar Björnham, Mickaël Castelain, Efstratios Koutris, Staffan Schedin, Erik Fällman, and Magnus Andersson.  
*In Single molecule spectroscopy in chemistry, physics and biology : Nobel symposium*, volume 96 of Springer Series in Chemical Physics, page 572 p. Springer Verlag, 2010. doi : 10.1007/978-3-642-02597-6 18. Series editors : A. W. Castleman, Jr. , J. P. Toennies , K. Yamanouchi , W. Zinth  
<https://hal.inrae.fr/hal-02821467>

### 1.8.5 Communications orales

#### Conférences

- **C1 Approche locale des mécanismes d’adhésion de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur du verre**,  
Castelain, M., F. Pignon, J.-M. Piau, A. Magnin, M. Mercier-Bonin, P. Schmitz.  
10ème Symposium Prosétia CNRS-INRA, Mars 2005, Lille.
- **C2 Approche locale des mécanismes d’adhésion de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur du verre, mise en œuvre d’une pince optique.**  
Castelain, M., F. Pignon, J.-M. Piau, A. Magnin, M. Mercier-Bonin, P. Schmitz. 8ème Journées Jeunes Rhéologues, Mars 2006, Eveux-L’Arbresle.
- **C3 Mécanismes et cinétiques d’adhésion aux échelles microniques de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur du verre, quantification des forces d’interactions.**  
Castelain, M., F. Pignon, J.-M. Piau, A. Magnin, M. Mercier-Bonin, P. Schmitz.  
11ème Symposium Prosétia CNRS-INRA, Mars 2006, Paris, France.
- **C4 Mechanisms and kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* yeast adhesion on glass surfaces, probed by optical tweezers.**  
Castelain, M., F. Pignon, J.-M. Piau, A. Magnin, M. Mercier-Bonin, P. Schmitz,  
4th Annual European Rheology Conference (AERC), Avril 2007, Naples, Italie.
- **C5 Unraveling the Secrets of Bacterial Adhesion Organelles using Single Molecule Force Spectroscopy**  
Axner, O., O. Björnham, M. Castelain, E. Fällman, E. Koutris, S. Schedin, M. Andersson,  
Nobel Symposium, Juin 2008, Stockholm.
- **C6 Helixlike pili is a prerequisite of uropathogenic *E. coli* to adhere to host and withstand urine flow,**  
Castelain, M., M. Andersson, E. Koutris, O. Axner,  
7th EBSA European Biophysics Congress, 14 Juillet 2009, Gênes, Italie.
- **C7 Quantifying the Force Response of Pili**  
Koutris, E., M. Castelain, M. Andersson,  
Optical Tweezers Unravel the Secrets of Bacterial Adhesion, 1st Optical Tweezers Symposium, 2 Février 2009, Zürich.
- **C8 Unraveling the secrets of attachment organelles and adhesion of piliated bacteria using force measuring optical tweezers**  
Axner, O, M. Andersson, O. Björnham, M. Castelain, J. Klinth, E. Koutris,  
“Scanning Probe Microscopy and Optical Tweezers in Life Science”, 7 Octobre 2010, Berlin, Allemagne.

- **C9** **Unraveling the muco-adhesion of *Lactococcus lactis* using shear-stress flow and particle tracking**,  
Tran, TL, MP Duviau, MP Chapot-Chartier, M Castelain, and M Mercier-Bonin,  
Journées des Microbiologistes de l'INRA, 15 Novembre 2012, l'Isle-sur-la-Sorgue.
- **C10** **Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis***,  
Tran, TL, D.T.L. Le, M.-P. Duviau, M. Meyrand, Y. Guérardel, M. Castelain, P. Loubière, M.-P. Chapot-Chartier, E. Dague, and M. Mercier-Bonin,  
Club des Bactéries Lactiques, 16-18 octobre 2013, Bordeaux.
- **C11** **Analyse des propriétés de surface de lactocoques issus de laits crus de chèvre**,  
Jard, J., M. Castelain, M. Rayme, C. Couderc, C. Philippe, P. Schmitz, M. Cocaïgn-Bousquet, H. Tormo,  
10<sup>e</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie, 31 mars - 1er avril 2014, Paris.
- **C12** **Adhésion microbienne sur des surfaces inertes : outils et développements**,  
M. Castelain, P. Schmitz,  
Workshop "Autour des Capteurs environnementaux" 19 novembre 2014, Nailloux.  
**Conférence invitée.**
- **C13** **Nanomechanics and functional role of *Lactococcus lactis* pili in adhesion to mucins under dynamic conditions**,  
M. Castelain, M.-P. Duviau, V. Oxaran, P. Schmitz, M. Cocaïgn-Bousquet, P. Loubière, J.-C Piard, M. Mercier-Bonin,  
7<sup>e</sup> colloque du Réseau National Biofilms, 2-3 décembre 2015, Toulouse.
- **C14** **The nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* pili are conditioned by the polymerized backbone pilin**,  
M. Castelain, M.-P. Duviau, P. Schmitz, P. Loubière, M. Cocaïgn-Bousquet, J.-C. Piard, M. Mercier-Bonin,  
NanoInBio 2016, 2 juin 2016, Le Gosier, Guadeloupe.
- **C15** **Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis***  
Thi-Ly Tran, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Mickaël Meyrand, Yann Guérardel, Etienne Dague, Muriel Mercier-Bonin, M. Castelain,  
1 International Fish – Microbiota Workshop, 19 juin 2017, Trondheim, Norvège.  
**Conférence invitée.**
- **C16** **le contrôle de *Pseudomonas* par des biofilms positifs de lactocoques dans l'industrie laitière est-il possible ?**,  
Ibrahima Dramé, Gwénaëlle Jard, Sara Afonso, Mickaël Castelain, Hélène Tormo, Christine Roques, Sophie Pécastaings,  
8<sup>e</sup>me colloque du Réseau National Biofilms, 5-6 décembre 2017, Clermont-Ferrand.
- **C17** **A multi-scale study of the flocculation/flotation mechanism of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* under increased pH**  
C. Formosa-Dague, V. Gernigon, M. Castelain, F. Daboussi, P. Guiraud,  
NanoInBio 2018, 23 mai 2018, Le Gosier, Guadeloupe.
- **C18** **Role of *Lactococcus lactis* pili in homotypic interactions using single-molecule force spectroscopy**,  
Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Laforgue, Etienne Dague, Mickaël Castelain,  
BioPhysAdh, 10-11 septembre 2018, Toulouse.

- **C19 Antifouling coatings for the protection of surfaces exposed to continental superficial waters,**  
Zibin Nan, Yanzhu Tao, Jane Jandel, Diane Samelor, Didier Combes, Claire Tendero, Mickaël Castelain,  
BioPhysAdh, 10-11 septembre 2018, Toulouse.
- **C20 Revêtements anti-salissures pour la protection des surfaces exposées aux eaux superficielles,**  
Zibin Nan, Yanzhu Tao, Jane Jandel, Diane Samelor, Didier Combes, Claire Tendero, Mickaël Castelain,  
JADH, 18 décembre 2018, Annecy.
- **C21 Pili drive homotypic interactions to form biofilm in *Lactococcus lactis* : A single-molecule force spectroscopy study,**  
Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Laforgue, Etienne Dague, Mickaël Castelain,  
GDR B2I, 21-22 septembre 2021, Toulouse.
- **C22 Targeting conditioning film to prevent from biofouling**  
Zibin Nan, Didier Combes, Mickaël Castelain,  
5th International Conference on Materials and Nanotechnology, 20-21 Avril 2023 Paris.  
**Conférence invitée.**
- **C23 Antibiofouling strategies – towards green alternatives**  
Mickaël Castelain,  
Nanomaterials-eCon2023, 12 juin 2023, Londres, UK.  
**Conférence invitée.**
- **C24 Single-molecule force spectroscopy to unveil fundamentals of biofilm formation**  
Mickaël Castelain,  
Nanomaterials-eCon2023, 13 juin 2023, Tokyo, Japon.  
**Conférence invitée.**
- **C25 Active enzyme surfaces to struggle biofouling**  
Mickaël Castelain, Zibin Nan, Didier Combes,  
NANOMAT 2023, 25-27 septembre 2023 Barcelone, Espagne.  
**Conférence invitée.**

**Communications dans des congrès et colloques : conférence invitée**

Communications **C12**, **C15**, **C22-25**.

**Communication à des congrès et colloques : article à comité de lecture**

- **C5 Unraveling the Secrets of Bacterial Adhesion Organelles using Single Molecule Force Spectroscopy**  
Axner, O., O. Björnham, M. Castelain, E. Fällman, E. Koutris, S. Schedin, M. Andersson,  
Nobel Symposium, Juin 2008, Stockholm.

**Communication à des congrès et colloques : poster**

- **P1 Helixlike pili is a prerequisite of uropathogenic *E. coli* to adhere to host and withstand urine flow,**  
Castelain, M., M. Andersson, E. Koutris, O. Axner,

- “The Physics of Cell – From the Edge to the Heart”, Primošten, Croatie, Septembre 2009.
- **P2 Force-vs.-elongation properties of pneumococcal T4 pili – A comparison between helix-like and open coil-like pili**,  
Castelain, M., E. Koutris, M. Andersson, K. Wiklund, O. Björnham, S. Schedin, and O. Axner,  
“The Physics of Cell – From the Edge to the Heart”, Primošten, Croatie, Septembre 2009.
  - **P3 Unraveling the role of pili and mucus-binding protein in adhesion of a natural isolate of *Lactococcus lactis* to intestinal epithelial cells and to mucins**,  
Chapot-Chartier M.P., Meyrand M., Le D.T.L., Tran T.L., Duviau M.P., Castelain M., Guillot A., Goin M., Furlan S., Armalyte J., Kulakauskas S., Cortes-Perez M., Chat S., Dupres V., Hols P., Dufrière Y., Thomas G., Trugnan G., Loubière P., Dague E. and Mercier-Bonin M.,  
11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, Pays-Bas, 31 août-4 Septembre 2014.
  - **P4 Caractérisation physico-chimique de surface de lactocoques**,  
G. Jard, C. Philippe, M. Rayme, P. Schmitz, H. Tormo, M. Castelain,  
1<sup>re</sup> Journée Technique de la Halle Technologique Alimentaire de Purpan, Toulouse, 18 septembre 2015.
  - **P5 Une orientation positive des biofilms dans la machine à traire ?**,  
G. Jard, M. Castelain, H. Tormo,  
1<sup>ère</sup> Journée Technique de la Halle Technologique Alimentaire de Purpan, Toulouse, 18 septembre 2015.
  - **P6 Sélection de souches de *L. lactis* isolés de laits crus de chèvre pour la formation d’un biofilm positif dans la machine à traire**,  
G. Jard, C. Philippe, M-P. Duviau, M.-L. Mingot-Daveran, P. Schmitz, H. Tormo, M. Castelain,  
7<sup>e</sup> colloque du Réseau National Biofilms, Toulouse, 2-3 décembre 2015.
  - **P7 Surface engineering of fluid interfaces for enhancing microalgae flotation efficiency**,  
C. Formosa-Dague, M. Castelain, P. Guiraud,  
GDR Bio-ingénieries des interfaces, Bordeaux, 28-29 juin 2017.
  - **P8 Fonctionnalisation d’interfaces fluides pour l’amélioration de la récolte d’algues par flottation**,  
C. Formosa-Dague, M. Castelain, P. Guiraud,  
FrancoFilt 2017, Bordeaux, 29 Août 2017.
  - **P9 Controlling negative flora in dairy industry with positive biofilms ?**  
S. Pécastaings, G. Jard, I. Dramé, M. Castelain, P. Schmitz, C. Couderc, H. Tormo, C. Roques,  
Eurobiofilms 2017, Amsterdam, 19-22 septembre 2017.
  - **P10 To stick or not to stick ? Pulling pili shed some light on biofilm formation**.  
M. Castelain, M. Mercier-Bonin, M. Coccagn-Bousquet, P. Schmitz, J.-C. Piard,  
8<sup>ème</sup> colloque du Réseau National Biofilms, Clermont-Ferrand, 5-6 décembre 2017.  
**Prix du meilleur poster.**
  - **P11 Selecting raw goat milk *Lactococcus lactis* to produce positive biofilm in milking machine : A tale of biopreservation ?**

- G. Jard, C. Philippe, M. Ammar, M.-P. Duviau, C. Couderc, M.-L. Daveran-Mingot, P. Schmitz, H. Tormo, M. Castelain,  
8<sup>e</sup>me colloque du Réseau National Biofilms, Clermont-Ferrand, 5-6 décembre 2017.
- **P12 To stick or not to stick ? Pulling pili shed some light on biofilm formation.**P12 M. Castelain, M. Mercier-Bonin, M. Cocaign-Bousquet, P. Schmitz, J-C. Piard,  
Biofilms 8, Aarhus, Danemark, 27-29 mai 2018.
  - **P13 Selecting raw goat milk *Lactococcus lactis* for sustainable biopreservation ?**  
G. Jard, S. Pécastaings, I. Dramé, P. Schmitz, H. Tormo, M. Castelain, C. Roques ,  
Biofilms 8, Aarhus, Danemark, 27-29 mai 2018.
  - **P14 Selecting raw goat milk *Lactococcus lactis* for sustainable biopreservation ?**,  
G. Jard, S. Pécastaings, I. Dramé, P. Schmitz, H. Tormo, M. Castelain, C. Roques,  
BioPhysAdh, Toulouse, France, 10-11 septembre 2018.
  - **P15 Role of *Lactococcus lactis* pili in homotypic interactions using single-molecule force spectroscopy**,  
Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Lafforgue, Mickaël Castelain, Etienne Dague,  
XI. Linz Winter Workshop 2019 Feb 2019.
  - **P16 Role of *Lactococcus lactis* pili in homotypic interactions using single-molecule force spectroscopy**,  
Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Lafforgue, Mickaël Castelain, Etienne Dague,  
Ecole Thématique CNRS BioSurf'2019 3-7 Juin 2019.
  - **P17 A tale of pili on *Lactococcus lactis* : from adhesion to biofilm** Mickaël Castelain, Jean-Christophe Piard, Etienne Dague,  
GDR B2I Toulouse – 21-22 septembre 2021.
  - **P18 Targeting conditioning film to prevent from biofouling**  
Zibin Nan, Didier Combes, Mickaël Castelain,  
NANOMAT 2023, 25-27 septembre 2023 Barcelone, Espagne.
  - **P19 Investigation of a Hydrophobic Lipid-Based Solid Formulation Technology for Biomolecule Protection in Enhancing Exocrine Pancreatic Function**  
Alexis Bages, Mickaël Castelain, Nicolas Dietrich, and Karim Ioualalen  
SFNano 2023, 4-6 Décembre, Montpellier.
  - **P20 Morphological analysis of lignocellulose-degrading filamentous fungi : from filament to pellet**  
Thao-Anh Nguyen, Luc Fillaudeau, Thanh Nguyen Vu, Tuan-Anh Pham, Mickaël Castelain  
LignoBiotech 2024, 4 novembre, Toulouse.
  - **P21 Comparative Study of the Therapeutic Efficacy and Enhanced Patient Compliance of the LMP Formulation in the Treatment of EPI Versus Current PERTs**  
Alexis Bages, Jessica Tran, Cloé Fabre, Mickaël Castelain, Nicolas Dietrich, and Karim Ioualalen  
SFNano 2024, 3-5 Décembre, Toulouse.

### Séminaires invités (après doctorat)

- **S1** Research activity LISBP, Toulouse 13/01/2010
- **S2** Machineries for dampening forces : fimbria on bacteria scrutinized by single-molecule force spectroscopy Biotec Center, Dresden 01/03/2010
- **S3** Interactions mucus / flore intestinale : de l'échelle moléculaire à multicellulaire «Journée Plateau Écologie», LISBP, Toulouse, 10/02/2011
- **S4** Techniques de pince optique, Séminaire équipe «Génie du métabolisme des procaryotes» LISBP, Toulouse, 18/07/2011
- **S5** Interactions mucus / flore intestinale : de l'échelle moléculaire à multicellulaire, Visite du département INRA CEPIA, 20/09/2011
- **S6** Compréhension mécanistique et multi-échelles des interactions microbiote/mucus intestinal : applications aux bactéries lactiques, Séminaire Jeunes Recrutés CEPIA, Toulouse
- **S7** Mécanismes de la muco-adhésion bactérienne de l'échelle moléculaire à multicellulaire : techniques et développement, MICALIS, Jouy-en-Josas 21/06/2012
- **S8** Machineries for dampening forces : fimbria on bacteria scrutinized by single-molecule force spectroscopy, séminaire unité LISBP, Toulouse 10/01/2013
- **S9** Caractérisation des propriétés biomécaniques des pili de *Lactococcus lactis* par pince optique, Séminaire équipe «Génie du métabolisme des procaryotes» LISBP, Toulouse, 21/01/2013
- **S10** Séminaire «Transversalité Biomasse» LISBP, Toulouse, 28/05/2013
- **S11** Biophysique intégrative des interfaces, séminaire équipe, LISBP, Toulouse, 12/09/2013
- **S12** Rôle des pili dans la muco-adhésion chez *L. lactis*, Séminaire équipe «Génie du métabolisme des procaryotes» LISBP, Toulouse, 19/05/2014
- **S13** Nanomechanics and functional role of *Lactococcus lactis* pili in adhesion to mucin under dynamic conditions, séminaire équipe, LISBP, Toulouse 21/01/2016
- **S14** A tale of *L. lactis* pili : adhesion and nanomechanics, NTNU, Trondheim, 14/09/2016
- **S15** Pili on *Lactococcus lactis* : from adhesion to biofilm, FIRI, Hanoi Vietnam 06/12/2022
- **S16** How may the adhesion of microbial contaminants be investigated at lab scale? Master ELITE, HUST, Hanoi, Vietnam 05/12/2022
- **S17** TIM and TBI activities, CRDB, Hanoi, Vietnam, 05/12/2022
- **S18** Active enzyme surfaces to struggle biofouling, Merton College, Oxford University, Oxford, UK. 10/07/2024
- **S19** Single-molecule force spectroscopy to unveil fundamentals of biofilm formation, University College, Oxford University , Oxford, UK. 11/07/2024

### Autres communications et diffusion scientifique au grand public

- **2009.** Workshop *Microscopy in Microbial Systems*, Umeå University. Atelier pince optique.
- **2010-2018.** Interventions diverses : Collège André Abbal de Carbonne (11-14 ans), École élémentaire Marqufave-Lacaugne (5-10 ans) : le métier de chercheur, découverte du monde infiniment petit (ateliers microscopie), biodiversité, l'hydrodynamique pour éteindre un feu, thermodynamique : propagation de la chaleur par les fumées lors d'un incendie,

- **2017.** Faits Marquants INRA-CEPIA :  
**Le pouvoir adhésif de *Lactococcus lactis* : une histoire tirée par les « pili » ?**
- **2017.** Article sur le site TBI :  
**"To stick or not to stick ? Pulling pili shed some light on biofilm formation"**
- **2017.** Communiqué de presse article **A11** :  
<http://www.lisbp.fr/fr/actualites/toutes-les-actus-du-moment/le-pouvoir-adhesif-de-lactococcus-lactis-une-histoire-tiree-par-les-pili.html>
- **2017** 54<sup>e</sup> Salon international de l'agriculture (Paris), stand INRAE : *Le microbiote*, ateliers microscopie grand public
- **2020.** Communiqués de presse article **A16** par
  - **TBI** : <http://www.toulouse-biotechnology-institute.fr/fr/actualites/toutes-les-actus-du-moment/communiqués-scientifiques/mesurer-la-capacite-d-adhesion-entre-deux-bacteries-a-l-aide-d-un-afm.html>
  - **INRAE** : <https://www.inrae.fr/actualites/mesurer-capacite-dadhesion-entre-deux-bacteries-laide-dun-microscope-force-atomique>
  - **INSA** : <http://www.insa-toulouse.fr/fr/actualites/mesurer-la-capacite-d-adhesion-entre-deux-bacteries-a-l-aide-d-un-afm.html>
  - **CNRS INSIS** : <https://insis.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/mesurer-la-capacite-dadhesion-entre-deux-bacteries-laide-dun-afm>
- **2020-2024.** Encadrement jeunes sapeurs-pompiers (JSP), section du Volvestre, apports théoriques (hydrodynamique, thermique, résistance des matériaux)
- **2022.** « Les pertes de charge : applications au quotidien » : section JSP de Samatan (32)
- **2022.** « Quelles alternatives aux peintures anti-fouling ? » Inauguration Port de Saint-Elme (conférence grand public) à la Seyne-sur-Mer,
- **2023.** Atelier de l'interdisciplinarité *l'ingénierie comme vecteur de l'interdisciplinarité* avec Toulouse Biotechnology Institute (TBI) <https://www.inrae.fr/evenements/ateliers-linterdisciplinarite>, 17 octobre.
- **2023.** Nuit européenne des chercheurs, animation du stand « la Grande Synchro », 29 septembre
- **2024.** Présentation Métier de Chercheur au Lycée Martin Malvy de Cazères (17/06)
- **2024.** Atelier de microscopie Lycée Martin Malvy de Cazères (19/06)



## Chapitre 2

# Bilan des travaux de recherches

Je rassemble dans ce chapitre les différentes réalisations scientifiques et techniques que j'ai pu entreprendre depuis le début de ma carrière scientifique dès la préparation au Doctorat. Le principal fil rouge de ce chapitre nous conduit à l'étude des mécanismes d'**adhésion microbienne et des interactions**.

Nous verrons dans ce chapitre que l'objet d'étude principal est le biofilm, selon une dimension *temporelle* - des premières étapes de sa formation à son développement et *spatiale* - de la molécule à la structure collective (voir figure 2.1 ci-dessous), mais aussi autour d'aspect *Bio-santé* avec l'étude des mécanismes d'adhésion de souches pathogènes exprimant des pili adhésifs, et donc leur propriétés mécaniques lorsqu'il sont soumis à une force d'arrachement.

Le biofilm est une communauté bactérienne, organisée et structurée, le plus souvent sur une surface solide qui a été initialement exposée à un environnement aqueux [4-6].

L'enjeu est de **comprendre et quantifier les interactions surface/micro-organisme et inter-micro-organisme** qui conduisent à la formation et la structuration d'un biofilm avant que celui-ci n'atteigne le stade de biofilm mature. De manière systémique, je m'intéresse au rôle des protéines de surface ancrées à la paroi d'un micro-organisme sur la formation et la structuration au niveau i) de l'attachement initial du micro-organisme à une surface, (ii) des mécanismes mis en jeu entre deux cellules dans le cas de l'auto-agrégation, brique élémentaire de la cohésion d'un biofilm, (iii) des propriétés nanomécaniques de ces protéines ou cellules lorsqu'elle sont soumises à des contraintes et enfin (iv) de l'architecture générale du biofilm en croissance.

Ce chapitre va tout d'abord présenter les principales réalisations techniques qui ont pu alimenter les différentes questions scientifiques liées aux interactions et l'adhésion microbienne. Sans être exhaustive, elle permettra de faciliter la lecture des sections qui suivent sur les activités scientifiques. A ce titre, elles seront organisées chronologiquement par période comme suit :

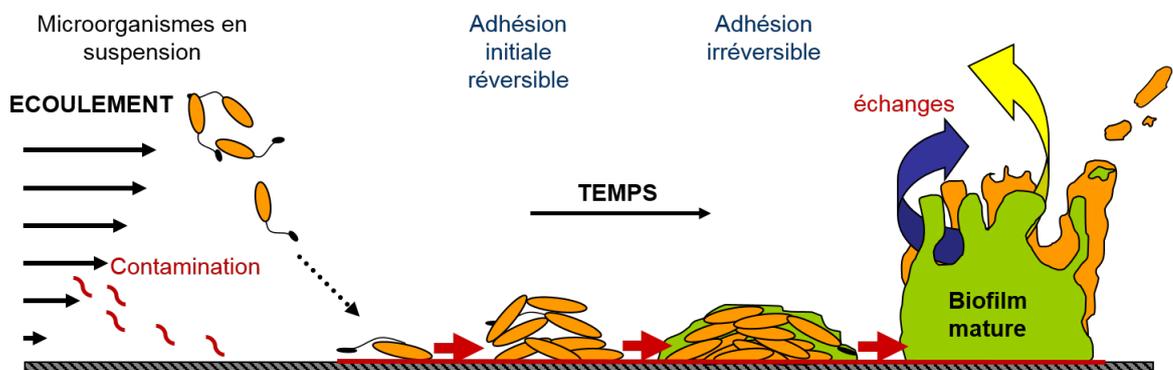


FIGURE 2.1 – Schéma représentatif du développement d'un biofilm en fonction du temps

1. Préambule technique
2. Période 2004-2007 : Projet de thèse de Doctorat (Grenoble)
3. Période 2008-2010 : Stage postdoctoral (Umeå, Suède)
4. Période 2010-2014 : Chargé de Recherche 2<sup>e</sup> classe dans Équipe Génie du Métabolisme des Procaryotes - LISBP, Toulouse
5. Période 2014-2023 : Chargé de recherche 2<sup>e</sup> et 1<sup>re</sup> classe dans l'équipe Transfert-Interface-Mélange - LISBP/TBI, Toulouse

## 2.1 Préambule technique

Au cours de mon parcours lié à la compréhension des mécanismes d'adhésion microbienne et la quantification des forces d'interactions, l'instrumentation de pince optique a été très souvent au coeur de mes activités (utilisation et développement). Aussi, afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, un préambule sur le principe est présenté ci-après.

Les principes fondamentaux du piégeage optique et le premier piège tridimensionnel stable, basé sur des faisceaux contre-propagatifs, ont été établis au début des années 1970 par Arthur Ashkin [7] permettant le contrôle et la manipulation non intrusive et extrêmement précise des objets biologiques vivants, par simple interaction avec la lumière. Le principe des pinces optiques repose sur le fait qu'un photon est porteur d'une quantité de mouvement,  $p = h/\lambda$ , où  $h$  est la constante de Planck et  $\lambda$  la longueur d'onde de la lumière, qui est modifiée lors de l'interaction avec la matière par réfraction ou diffusion. La modification de la quantité de mouvement (changement de direction) implique qu'une force agit sur l'objet. Cette force peut, par commodité, être décomposée en une force de diffusion et une force de gradient ; la première agissant dans le sens de la propagation de la lumière et la seconde dans le sens du gradient de l'intensité. En outre, une particule est piégée au point où les forces de gradient et de diffusion s'équilibrent, c'est-à-dire légèrement après le foyer. Pour un piège optique à faisceau unique, il faut un gradient d'intensité élevé, ce qui est plus facile à réaliser grâce à l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique (N.A.), comme le montre la figure 2.2 ci-après.

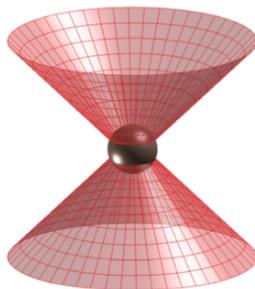


FIGURE 2.2 – Illustration d'une particule piégée dans un faisceau laser focalisé. La particule est tirée vers la position dans la région focale où les forces s'équilibrent.

Bien que le concept de pression de radiation soit connu depuis des siècles, il n'est pas trivial de proposer une description théorique du piégeage optique de taille micrométrique par un faisceau laser fortement focalisé qui soit à la fois généralement valable et facile à utiliser. Pour simplifier la description du piégeage optique, deux approximations dépendantes de la taille sont faites, qui correspondent bien aux résultats expérimentaux, appelées approximations de Rayleigh et de l'optique géométrique. La première est valable pour des objets beaucoup plus petits que la longueur d'onde de la lumière, c'est-à-dire  $\ll \lambda$ , tandis que la seconde est valable pour des objets plus grands, donc  $\gg \lambda$ . Au cours de mon parcours, j'ai eu à utiliser des faisceaux laser allant de 800 nm à 1064 nm, considérant des particules (vivantes ou non) piégées

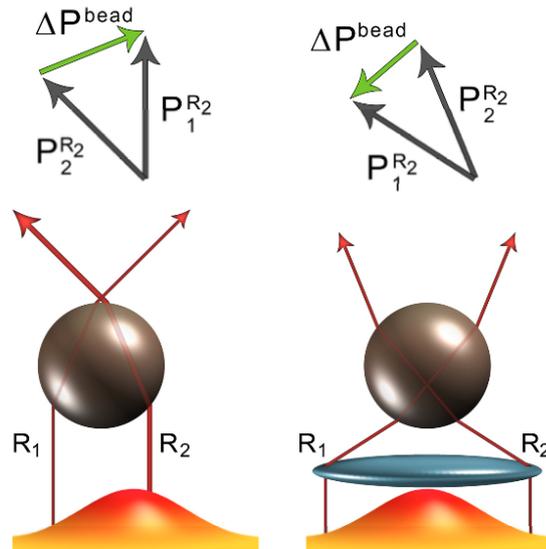


FIGURE 2.3 – La description des rayons est illustrée schématiquement pour une particule solide diélectrique sphérique dont l'indice de réfraction est supérieur à celui du milieu environnant. Le faisceau incident a une distribution d'intensité gaussienne illustrée par les couleurs jaune et rouge correspondant respectivement aux faibles et fortes intensités. La flèche verte représente le changement de quantité de mouvement  $\Delta P^{bead}$  que subira l'objet en raison de la réfraction du rayon  $R_2$ . Sur le côté gauche, les rayons sont collimatés, ce qui entraîne une force de rappel latérale (force de gradient) sur la particule légèrement déplacée vers la gauche ici. L'impact du rayon  $R_1$  est nettement plus faible que celui du rayon  $R_2$  en raison de l'intensité plus faible à mesure que l'on s'éloigne du centre. Cependant, cette configuration ne constitue pas un piège stable puisque la particule est constamment poussée dans la direction de propagation en raison de la pression de radiation. Sur le schéma de droite, une lentille convergente est introduite (typiquement un objectif de microscope), ce qui conduit à un faisceau fortement focalisé. La particule est ici déplacée dans la direction axiale, ce qui entraîne une force de rappel. Le changement de quantité de mouvement  $\Delta P^{bead}$  du second rayon,  $R_2$ , annule la contribution latérale de  $R_1$  et double l'effet de rappel dans la direction axiale. Cette configuration permet d'obtenir un piège optique tridimensionnel stable avec faisceau unique. Cette figure provient de la thèse d'Oscar Björnham (Umeå University, 2009).

au delà du micromètre. L'optique géométrique est donc l'approximation la plus adaptée telle qu'élaborée par Arthur Ashkin [8] et résumée par le schéma ci-après (Figure 2.3).

Les pinces optiques ne sont pas seulement capables de piéger des objets à des fins de manipulation ; elles peuvent également être utilisées directement pour mesurer et appliquer des forces de l'ordre du picoNewton. Le piège optique enferme la particule dans un potentiel harmonique tridimensionnel qui, pour une direction unique, peut être décrit comme  $E(x) = kx^2/2$ , où  $k$  est la constante harmonique. Ainsi, la force dépend linéairement du déplacement et suit un comportement Hookéen, comme l'illustre la figure 2.4. Ainsi, en mesurant la position d'une particule dans un piège, la force à laquelle elle est exposée peut être déterminée avec précision.

Un certain nombre de techniques permettant d'obtenir la position d'une particule piégée ont été mises au point au fil des ans [9, 10]. Les différentes techniques sont basées sur des principes légèrement différents et ont donc des propriétés dissemblables. Une approche directe utilise une caméra vidéo qui, avec un algorithme de recherche de centroïde, peut déterminer la position de l'objet. Cependant, la précision et la vitesse de cette technique sont limitées par la résolution optique et la vitesse d'échantillonnage maximale, qui est souvent limitée au taux d'acquisition de l'image, généralement jusqu'à 120 Hz [9], même si les technologies actuelles

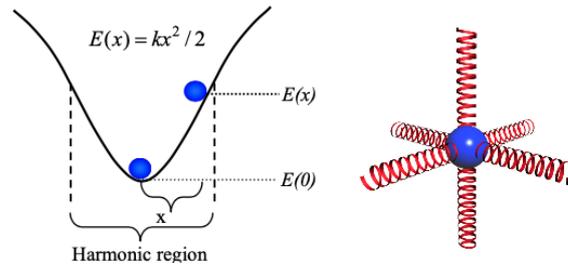


FIGURE 2.4 – L’illustration de gauche montre une particule piégée et confinée dans un potentiel harmonique avec une constante harmonique  $x$  assimilée à la raideur d’un ressort  $\kappa$ , pour un petit déplacement  $x$ . La particule peut être envisagée comme si elle était attachée à des ressorts microscopiques (illustration de droite). L’énergie de la particule confinée dans ce potentiel harmonique est alors donnée par  $E = \kappa x_i^2 / 2$ , où  $i$  correspond aux directions  $x$ ,  $y$ ,  $z$ .

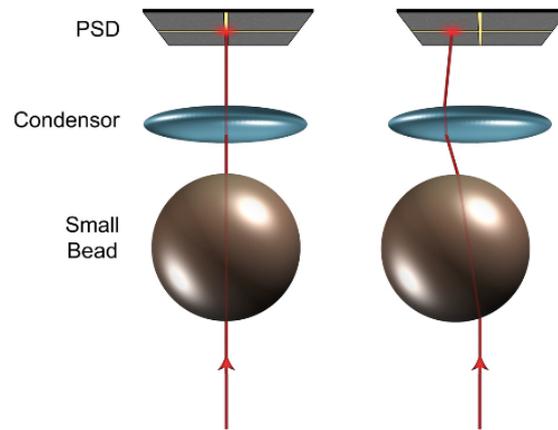


FIGURE 2.5 – Principe de mesure de la distance de séparation entre la particule piégée et sa position d’équilibre dans le volume focal. La particule agit comme une lentille qui réfracte le faisceau lorsqu’elle est déplacée (ou retenue). Le signal est alors mesuré par une diode qui renvoie la valeur de déplacement.

repoussent ces limites avec 6 kHz par exemple [11].

Une meilleure approche consiste donc à utiliser une méthode de mesure de position basée sur le laser, soit en employant le laser utilisé pour le piégeage, soit un second laser dédié de faible puissance. Une technique sensible de mesure de position par laser est basée sur l’interférométrie de polarisation utilisant le laser de piégeage [12]. L’inconvénient de cette méthode est qu’elle ne peut mesurer les déplacements que dans une seule dimension. Pour contourner ce problème, la détection du plan focal arrière (BFP) permet de mesurer tous les axes d’intérêt. Elle repose sur l’interférence entre la lumière diffusée vers l’avant par la particule et la lumière non diffusée [13-15]. L’interférence est mesurée par un détecteur de position (PSD) ou une photodiode à quadrant (QPD) sur l’axe optique à un plan conjugué au plan focal du condenseur [13]. Un exemple illustré ci-dessous en Figure 2.5 permet de montrer la déviation du faisceau lorsque la particule piégée est décentrée du volume focal du piège optique, entraînant une déviation du faisceau. Une calibration permet de connaître la distance réelle dans l’échantillon à partir des données acquises par la diode (PSD ou QPD).

A partir de l’équation de Hook,  $F_{ext} = \kappa \Delta x$  où  $\Delta x$  est la distance entre la position d’équilibre dans le piège et la position de la particule lorsqu’elle est soumise à une force extérieure  $F_{ext}$ , il est alors possible de mesurer quantitativement et en temps réel la force appliquée  $F_{ext}$ . Pour cela, il suffit à présent de connaître la raideur de ce "ressort" optique  $\kappa$ .

Plusieurs méthodes sont possibles, nous en retiendrons deux utilisées dans mes activités.

**METHODE DE STOKES.** Cette méthode est décrite et affinée dans l'article A8 [16]. Elle consiste à utiliser la force de traînée hydrodynamique pour éjecter la particule du piège optique. En pratique, la particule piégée est déplacée au moyen du platine par des mouvements de va-et-vient à une vitesse contrôlée afin d'atteindre la force maximale du piège. La force  $F$  ( $N$ ) est ensuite calculée par le modèle de Stokes (sphère solide, dure et non déformable, loin des parois) soit :

$$F = 6\eta RV, \quad (2.1)$$

où  $\eta$  est la viscosité dynamique ( $Pa.s$  ou  $N.s.m^{-2}$ ) du milieu suspendant,  $R$  ( $m$ ), le rayon de la sphère et  $V$  ( $m.s^{-1}$ ) sa vitesse. La température sera ici corrélée à la viscosité. Une approximation en fonction de la distance à la paroi ainsi que la forme de l'objet a été modélisée dans l'article A8 (non détaillée ici).

**METHODE DU MOUVEMENT BROWNIEN.** Une particule est sujette au mouvement stochastique des molécules qui l'entoure. Ces mouvements sont liés à la température et lorsqu'une particule est libre dans un milieu liquide, son mouvement suit une loi de diffusion libre. En revanche, lorsque la particule est piégée dans le potentiel harmonique (voir figure 2.4), le mouvement est restreint. Nous avons vu que la position de la particule est suivie au moyen d'une diode (QPD) ou capteur (PSD). Le mouvement d'une particule piégée peut être décrit par l'équation de Langevin étendue avec une partie harmonique comme suit :

$$\gamma \frac{dx}{dt} + kx = F(t), \quad (2.2)$$

où  $\gamma$  est le coefficient de traînée visqueuse et  $F(t)$  la force aléatoire, dont la moyenne est égale à 0 [17]. La masse et le moment d'inertie de la particule peuvent être négligés [18]. Pour une particule confinée dans un piège, les fluctuations de déplacement dans le domaine des fréquences peuvent être dérivées par une transformée de Fourier de l'équation 2.2. La densité spectrale de puissance de  $F(t)$ ,  $S_F(\mathcal{F})$ , peut, pour un mouvement brownien idéal, être écrit comme,  $S_F(\mathcal{F}) = |\mathcal{F}(f)|^2 = 4\gamma kT$ , où  $\mathcal{F}(f)$  est la transformée de Fourier de  $F(t)$  [18]. La densité spectrale de puissance du mouvement d'une particule,  $S_x(f) = |X(f)|^2$  prend une forme lorentzienne et peut être exprimée comme suit :

$$S_x(f) = \frac{kT}{\gamma\pi^2(f^2 + f_c^2)}, \quad (2.3)$$

où  $k$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température, et  $f_c$  la fréquence limite entre la diffusion restreinte et libre, définie par la raideur  $\kappa$  du piège soit,  $f_c = \kappa/\pi\gamma$ . Les courbes expérimentales sont ensuite modélisées avec l'équation 2.3 pour en extraire la raideur du piège  $\kappa$ . Un exemple de courbe ci-après en figure 2.6 permettent de montrer la variation du plateau (espace confiné), de la fréquence limite (rupture entre plateau et pente) en fonction de la puissance laser, qui conditionne *in fine* la raideur du piège ici exprimée en  $pN/\mu m$ .

A partir des concepts évoqués, je décrirai, dans les sections suivantes, les principales réalisations techniques que j'ai développé pour répondre aux différentes questions scientifiques rencontrées au cours de mon parcours.

## 2.2 Mécanismes d'adhésion de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur le verre

*Thèse de Doctorat (Frédéric Pignon et Jean-Michel Piau, Laboratoire de Rhéologie, INP Grenoble, Oct 2004 - Oct 2007. Financement : Allocation de Recherche Ministérielle.*

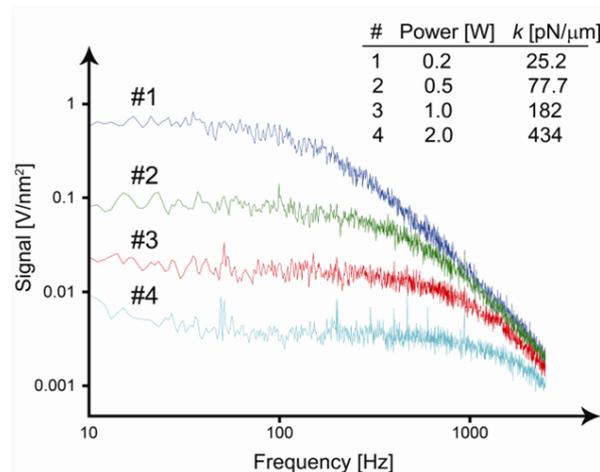


FIGURE 2.6 – Spectre de la densité spectrale de puissance de la position d'une particule ( $V/\mu m$ ) en fonction de la fréquence (Hz) pour différentes puissances laser.

Les micro-organismes sont présents dans des environnements à la fois naturels et industriels et leur adhésion aux surfaces exposées est inévitable. Les levures exploitent leur capacité à adhérer aux surfaces inertes comme les prothèses pour accéder au réseau sanguin et les organes internes des patients [19]. Les prothèses et cathéters peuvent servir à abriter et transporter des biofilms fongiques et fournissent ainsi un réservoir de cellules hautement résistantes aux substances chimiques, conduisant par exemple à la problématique des infections nosocomiales. En effet, les infections aux levures pathogènes présentent un taux élevé de mortalité [20] plaçant l'adhésion fongique au point névralgique de la médecine actuelle. L'adhésion puis la colonisation sont les meilleurs moyens pour les cellules de se protéger des agressions mécaniques et chimiques. La première étape de colonisation est l'adhésion initiale et c'est une des cibles cruciales de ce processus infectieux. La souche modèle non pathogène *Saccharomyces cerevisiae* présente l'intérêt d'être facilement modifiable (génomme entièrement séquencé) et d'être très similaire aux souches pathogènes, par exemple *Candida albicans*.

La thématique générale de ce travail est **l'exploration à l'échelle locale du micromètre des mécanismes impliqués dans l'adhésion de levures à un support**. Cette étude de l'adhésion à l'échelle locale de la cellule et aux premiers instants de l'adhésion a pour but de comprendre comment et pourquoi ces objets biologiques adhèrent aux surfaces. Afin de sonder les échelles pertinentes pour observer les mécanismes d'adhésion des levures, une technique de pince optique a été mise en œuvre. La pince est une instrumentation bien adaptée pour la manipulation des levures aux échelles du micron permettant d'accéder à une mesure de force nécessaire au détachement de micro-organismes initialement adhérent à une surface (Figure 2.7).

Une méthodologie de mesure quantitative et de préparation a été conçue. Ce projet a été le fruit d'une collaboration avec Muriel Mercier-Bonin et Philippe Schmitz (LISPB), dans le but de comparer les mesures effectuées à l'échelle de la population microbienne en chambre à écoulement cisailé [21-23] avec les mesures à l'échelle de la cellule effectuées par spectroscopie de force. Les micro-organismes utilisés sont des souches industrielles de levures *Saccharomyces cerevisiae*. Elles ont été simplement réhydratées [21, 24] ou cultivées [25, 26]. Différents paramètres ont été explorés qui sont la nature du milieu suspendant (solution saline à différentes forces ioniques, nature du cation utilisé, et température). Par ailleurs, la méthodologie de spectroscopie de force à l'échelle unicellulaire a été formalisée dans l'article A8 [16] par la méthode de Stokes vue précédemment avec l'équation 2.1 en page 33.

La surface utilisée est un verre orienté dans l'échantillon de deux façons différentes : i) de *profil* : le verre est usiné « à façon » de manière à être inséré entre lame et lamelle, présentant

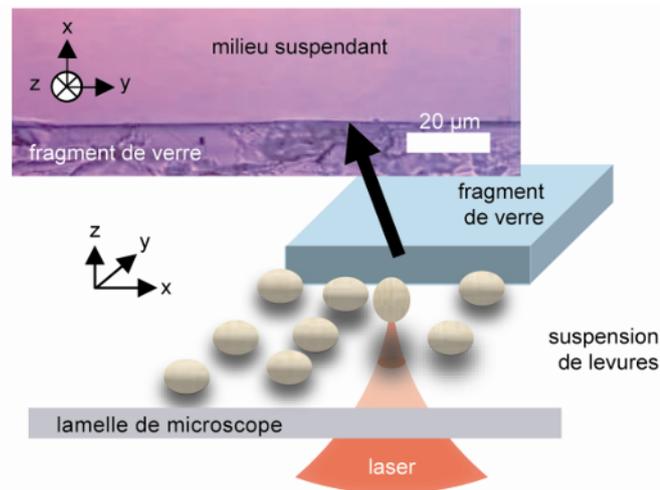


FIGURE 2.7 – Dispositif expérimental pour l'étude de l'adhésion-détachement d'une levure individuelle manipulée par la pince optique. Le support d'adhésion peut être horizontal (lamelle de microscope) ou vertical (fragment inséré; cliché sur la figure), échelle  $20 \mu\text{m}$ .

sa surface d'adhésion perpendiculaire à la lamelle ; ii) *horizontale* : ici la lamelle couvre-objet est utilisée comme surface d'adhésion.

**APPROCHE DE PROFIL.** Par micromanipulation d'une levure individuelle, amenée au contact de la surface, il est possible de suivre son mouvement relatif lorsqu'elle est déplacée parallèlement à la surface. En faisant varier des paramètres physico-chimiques comme la force ionique du milieu, des mécanismes d'adhésion/détachement ont pu ainsi être appréhendés [24, 25] : la levure adhère selon différents modes successifs : i) le glissement puis le roulement à  $1,5 \text{ mM NaCl}$  (Figure 2.8), ii) le glissement, le roulement partiel puis l'ancrage à  $15 \text{ mM NaCl}$  et iii) l'ancrage seul à  $150 \text{ mM}$ .

La figure 2.8 montre qu'il est possible de suivre le déplacement de la levure et son roulement induit par suivi des organites intracellulaires, beaucoup plus contrastés en microscopie champ clair. Les quatre premières vignettes sont le résultat de la décomposition d'un mouvement « aller » où aucun roulement n'est observé. Les vignettes suivantes, « le retour », suggèrent un glissement, puis un roulement de la levure à un instant donné, appelé ici *roulement partiel*. La nature, la portée et l'intensité relative des forces impliquées dans ces différents mécanismes d'adhésion sont déterminées grâce à une analyse qualitative à partir des théories DLVO<sup>1</sup> et DLVO étendue [27, 28]. Les calculs effectués mettent en évidence que les mécanismes d'adhésion observés et leurs évolutions avec la force ionique, sont principalement gouvernées par les forces d'interaction de Lifshitz-van der Waals et les répulsions électrostatiques auxquelles s'ajoutent des forces de contact liées à la sécrétion de glycoprotéines adhérentes, seules forces capables a priori de surpasser la répulsion à courte portée de type acide-base de Lewis.

**APPROCHE HORIZONTALE.** Ce travail aborde la notion de **spectroscopie de force**, *i.e.* la quantification de force d'interactions en fonction de différents paramètres contrôlés. Dans cette étude, ces paramètres sont le temps de contact, la force ionique, le type de cation ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) et la température ( $15\text{-}37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), pour une surface d'adhésion horizontale (lamelle couvre-objet) [16, 24]. Pour chaque levure piégée, une première analyse a été effectuée. Elle se repose sur un comptage systématique permettant de classer les levures adhérentes ou non. Ceci a permis de déterminer le taux d'adhésion, en figure 2.9 en fonction de la force ionique (Fig.2.9.a) et de la température (Fig.2.9.b) pour chaque cas de force ionique et cation. La

1. Derjaguin – Landau – Verwey – Overbeek

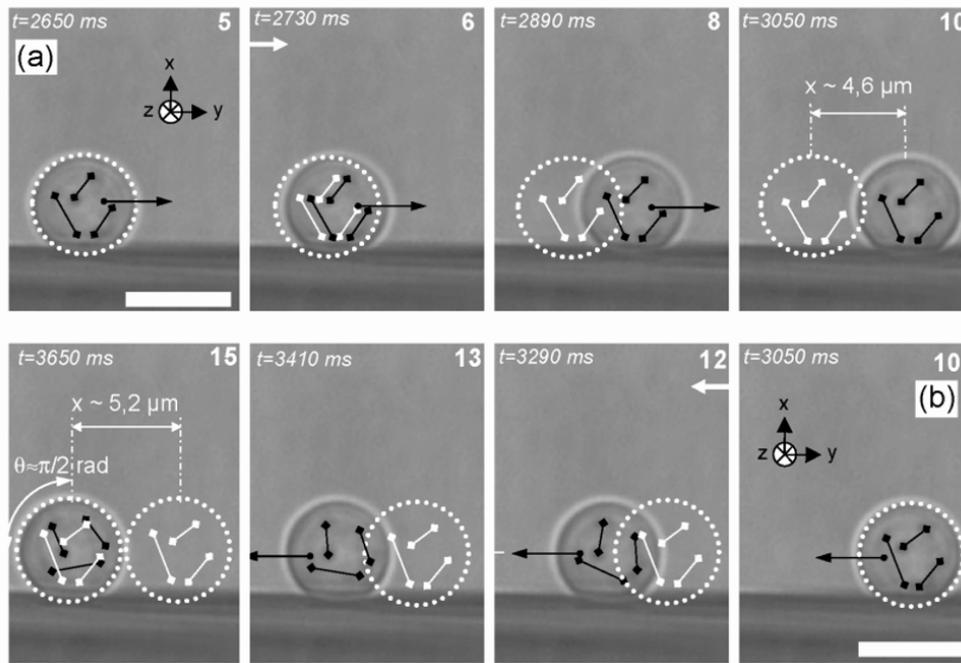


FIGURE 2.8 – Deux séries de quatre clichés successifs d’une levure à 1,5 mM en NaCl. Les marques blanches (altères et cercles en pointillés) représentent la position de la levure de (a) la vignette 5 et (b) la vignette 10. Barre d’échelle, 5  $\mu\text{m}$ .

Figure 2.9.a. montre que l’augmentation de la force ionique conduit à favoriser l’adhésion et que ce phénomène est d’autant plus fort en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, la Figure 2.9.b indique la variation du nombre de levures adhérentes, en fonction de la température, variant de 15°C à 37°C. Cette proportion de levures présente des valeurs similaires jusqu’à 25°C, puis chute brutalement à partir de 27°C. Cependant, cet effet de température est plus modéré en présence de calcium que de sodium. En conséquence, il ressort de l’ensemble de ces résultats que le calcium favorise l’adhésion indépendamment de la température sur un domaine de 15°C à 37°C. L’augmentation de la température facilite le détachement de manière notable avec le sodium mais elle a moins d’influence en présence de calcium. La figure 2.10 représente la répartition des niveaux de force en fonction de la force ionique et du cation. Sur chaque histogramme de type gaussien, la valeur est centrée sur un seul pic. Cette valeur augmente lorsque la force ionique est plus importante. Par ailleurs, à même force ionique, par exemple 150 mM, la valeur est centrée vers les faibles forces (0.75 pN) tandis qu’elle est centrée vers les forces plus élevées (4 pN) en présence de calcium. La présence de calcium réduirait l’effet du mouvement brownien et agirait probablement sur la stabilisation de protéines adhésives sécrétées équivalentes à celles qui régissent la floculation des levures.

Ce travail de thèse a fait l’objet de 4 articles publiés [A1-A3, A8] ainsi que plusieurs communications. Il a permis de démontrer le fort potentiel de l’instrumentation de pince optique tant par sa capacité à manipuler des objets vivants micrométriques que sa possibilité de quantifier des forces d’interaction de l’ordre de  $10^{-12}\text{N}$ . Au niveau technique, je n’ai pas effectué de développement particulier sur l’instrumentation existante, néanmoins ma contribution a été effective sur la conception d’une chambre thermostatée. J’ai également apporté un développement significatif sur la mise en oeuvre de mesure vue de profil, jamais explorée auparavant ainsi que l’approche méthodologique de mesure quantitative de force optique par la méthode de Stokes avec prise en compte de la géométrie de l’objet et sa distance à la paroi.

Plus spécifiquement, ce travail a également apporté une analyse fine à l’échelle de la cellule individuelle pour approfondir notre connaissance sur les mécanismes d’interactions de micro-organismes sur des surfaces inertes à l’échelle de la population.

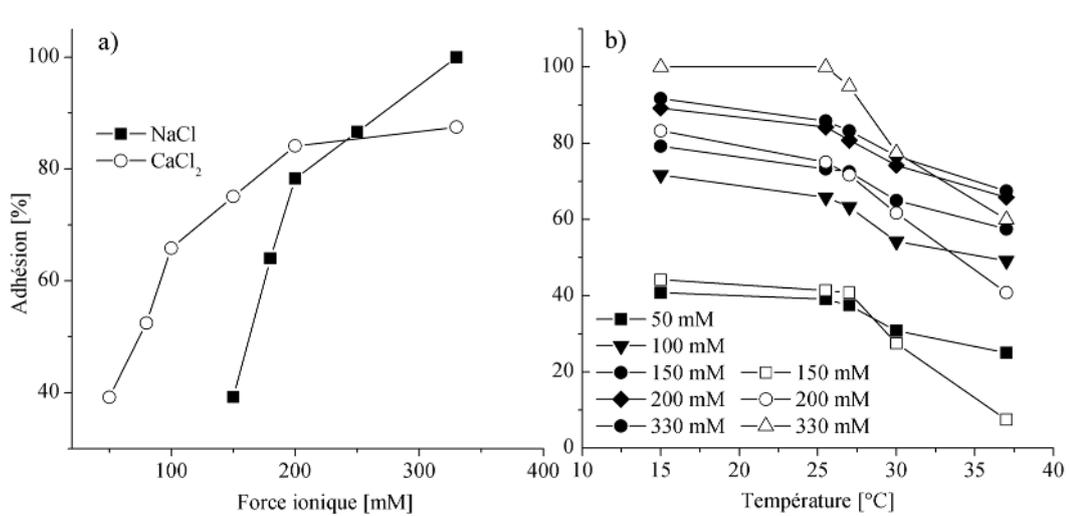


FIGURE 2.9 – Population de levures adhérentes (%) en fonction de (a) la force ionique et (b) température (°C) à 1 h de contact sur la lamelle.

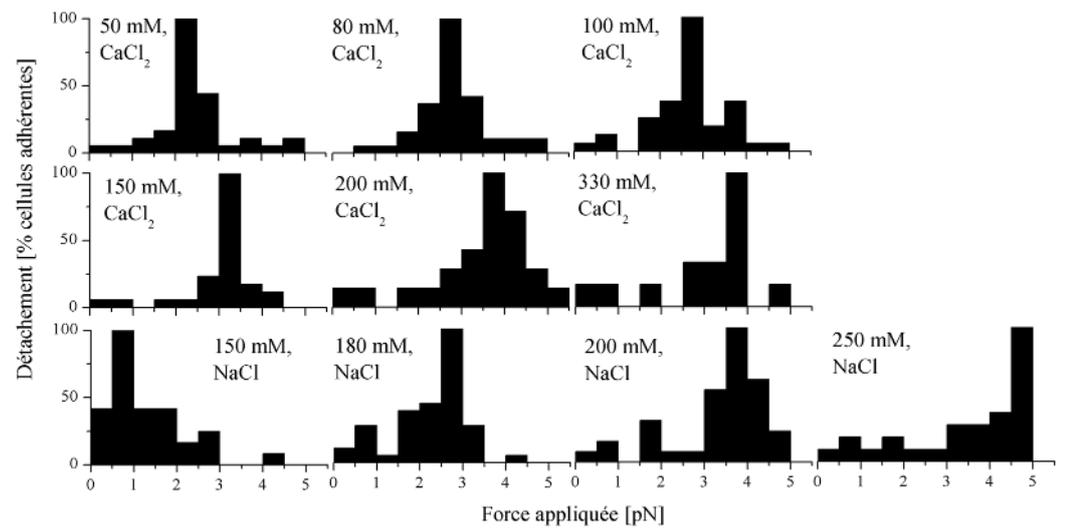


FIGURE 2.10 – Proportion de levures détachées (%) en fonction du niveau de force appliqué (pN) pour différentes forces ioniques (mM) CaCl<sub>2</sub> et en NaCl à 1h de contact avec la lamelle, pour une température  $T = (25,5 \pm 0,5) \text{ } ^\circ\text{C}$ .

La section suivante propose une analyse similaire en termes de spectroscopie de force par pince optique sur des bactéries pour une approche à l'échelle de la *Molécule Unique*.

## 2.3 Étude biophysique de protéines de surfaces adhésives de souches pathogènes

*Stage post-doctoral financé par la Fondation pour la Recherche Médicale (2008-2009) et la Faculté des Sciences et Technologies (2009-2011), Umeå Universitet (Umeå, Suède).*

### 2.3.1 Les pili d'*Escherichia coli* uropathogène médiateurs de l'adhésion - approche pluridisciplinaire et nanomécanique pour la Molécule Unique

La résistance des bactéries, et autres agents pathogènes, aux antibiotiques est une question sociétale omniprésente et en pleine croissance. Cette question nécessite d'être considérée par des moyens appropriés appartenant à notre futur proche. C'est aussi un consensus général vers le développement de nouveaux médicaments requérant l'identification de nouvelles cibles au sein de la bactérie. Puisque l'adhésion de bactéries pathogènes aux tissus de l'hôte est une première étape vers l'infection, les mécanismes de cette adhésion sont l'un des déterminants à considérer. Dans cette étude, l'adhésion de la bactérie *Escherichia coli* suggère l'intervention d'appendices accrochés sur la surface cellulaire qui ont une affinité particulière avec des sites propres aux tissus de l'hôte. Ces appendices, les fimbria (ou pili<sup>2</sup>), sont nombreux et varient selon la pathologie concernée (méningite, infections urinaires...). Une partie de cette structure, appelée adhésine située à la pointe, reconnaît les récepteurs hydrocarbonés de cellules eucaryotes au sein de l'hôte, conférant à la bactérie son pouvoir pathogène. Ce pilus est le médiateur fondamental de l'adhésion et par conséquent de l'infection. En effet, une étude de Åberg *et al.* [29] montre que la présence de molécules appelées « pilicides » permet de supprimer en grande partie l'expression de pili (biogenèse). Ils observent que la bactérie est dépourvue de pouvoir adhésif. Cette découverte constitue une étape majeure dans la recherche de composés alternatifs aux antibiotiques.

**Comprendre comment est régie cette biogenèse, ainsi que la capacité d'*E.coli* à s'adapter à son environnement, en optimisant sa stratégie d'adhésion, relève d'une importance cruciale pour éradiquer ce type d'affection.**

En effet, *in vivo*, de nombreuses forces entrent en jeu, et il nous appartient donc de comprendre les propriétés biomécaniques de tels appendices extracellulaires, notamment avec des moyens de la physique comme la pince optique. Tel que présenté en section précédente, cet instrument présente l'avantage de manipuler des objets biologiques micrométriques par simple action de la lumière. En effet, obéissant à la loi de conservation de la quantité de mouvement, chaque photon dévié de sa trajectoire par réfraction, génère une force très faible ( $pN = 10^{-12}N$ ) mais suffisante pour piéger des particules micrométriques ( $\mu m = 10^{-6}m$ ). Nous avons vu qu'un piège optique se comporte comme un ressort et qu'en mesurant sa distance d'élongation et sa raideur, il est possible d'évaluer la tension qui s'applique sur celui-ci. Cette technique permet ainsi d'apporter des informations quantitatives sur le comportement mécaniques d'une molécule lorsqu'elle est soumise à une force d'étirement et cinétique lorsque la contrainte appliquée varie en fonction du temps.

#### Approche biophysique : Mesure de force par pince optique

---

2. Dans la littérature, le terme *pili* soit dédié aux mécanismes de conjugaison tandis que les *fimbria* le sont pour l'adhésion. Au Département de Biologie Moléculaire à l'Université d'Umeå (Pr. Bernt Eric Uhlin), les pili sont reconnus comme étant les organelles adhésifs chez *E.coli*. Ce terme sera donc employé dans ce rapport quelque soit la souche et l'espèce étudiée.

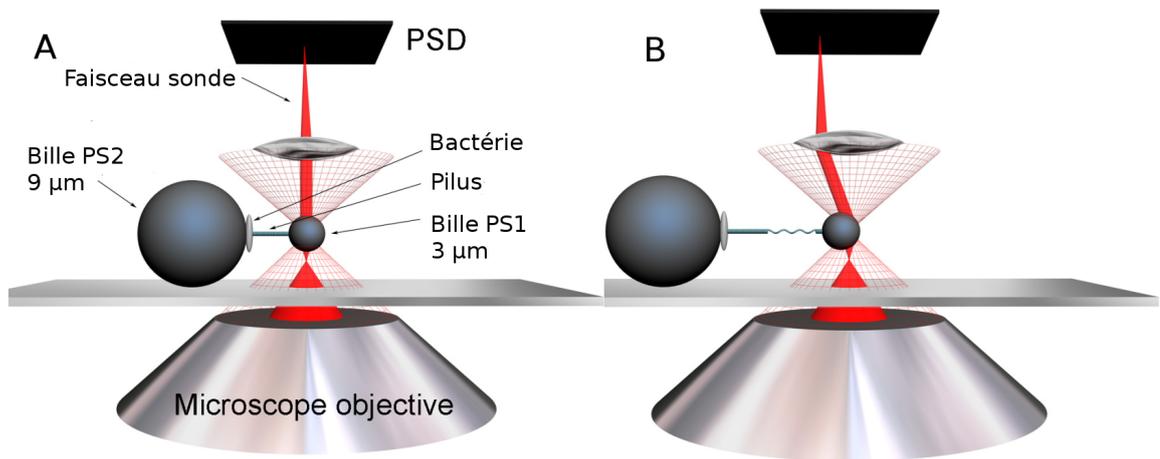


FIGURE 2.11 – (A-B) schéma expérimental d'un échantillon monté dans l'environnement de pince optique développé à l'Université d'Umeå. La bactérie est montée sur la bille PS2 (diamètre  $9,6 \mu\text{m}$ ). La bille PS1 (diamètre  $3 \mu\text{m}$ ) est piégée par le faisceau *piège* (en rouge, quadrillé). Elle fait également office de lentille convergente permettant de focaliser le faisceau *sonde* (en rouge, plein) sur la photo-diode (PSD). et permet de mesurer la force appliquée (faisceau *sonde* (en rouge)). (A) système au repos : le faisceau *sonde* est centré sur la photo-diode et (B) sous contrainte : la particule PS2 est déplacée ; le faisceau *sonde* est dévié et donne une information de déplacement sur la photo-diode et sur la force appliquée sur la particule PS2).

Une instrumentation de pince optique permet de piéger des particules modèles de polystyrène (PS1) de  $3 \mu\text{m}$ . Elle est constituée d'un faisceau *piège* et d'un faisceau *sonde* (voir fig 2.11). Le premier sert à manipuler les particules et le second, lorsqu'il est réfracté par la particule piégée, forme une image sur un détecteur photosensible qui indique le déplacement de la particule par rapport au faisceau *piège* (maintenu fixe).

Comme le montre la figure 2.11A, la préparation d'un échantillon consiste à monter une bactérie fraîchement cultivée sur un support chargé positivement (bille de PS de  $9,6 \mu\text{m}$ , PS2) lui-même fixé à la lamelle de microscope. En piégeant la bille PS1, il est possible d'obtenir une affinité non-spécifique avec plusieurs pili (non visible en microscopie en champ clair). Grâce à l'application d'une technique de va-et-vient (au moyen d'une platine piézo-électrique), il est ensuite possible de mesurer la force en temps réel et d'obtenir *in fine* un seul pilus accroché à PS1. Une fois que le pilus est isolé des autres, la platine piézo-électrique se déplace à vitesse contrôlée exerçant une force d'étirement. Pour une raideur donnée, la tension exercée est déterminée par la mesure de la déflexion de la pince (distance entre le faisceau *sonde* et faisceau *piège*). Cette valeur est donc **une information directe de la force intrinsèque du pilus lors de son déplieement/replieement.**

### Modèle *Sticky-Chain*.

Andersson *et al.* ont conceptualisé un modèle permettant de décrire le déplieement/replieement d'une structure quaternaire hélicoïdale à partir des mesures de forces d'étirement.[30-32].

Brièvement, la structure quaternaire est un assemblage linéaire de sous-unités appelées pilines (voir figure 2.12C). Chaque piline est reliée par des liaisons de type hydrophobes [33]. Lorsque la structure est repliée, chaque pas d'hélice (en moyenne toutes les 3 sous-unités) est liée à son pas voisin par des liaisons faibles de type hydrogène. Lorsque la structure est soumise à une force d'étirement, les liaisons hydrogènes s'allongent, donnant la *région I* (figure 2.12A) puis les liaisons hydrogène se rompent les unes après les autres provoquant une ouverture séquentielle des pas de l'hélice (appelée ici liaisons *Layer-to-Layer - LL*) observée par le plateau en *région II*. Enfin, lorsque tout est linéarisé, c'est la résistance mécanique des

liaisons hydrophobes qui conduit à la *région III* et décrit par le modèle d'Andersson *et al.* [31] par de l'élasticité entropique.

Le modèle prend donc la forme d'une équation statistique décrivant le taux d'ouverture de liaison  $LL$  pour un nombre de piline  $N_B$  donné lorsque le pilus est soumis à une force  $F$  selon le principe thermodynamique qu'une liaison est une barrière d'énergie à franchir pour passer d'un état *fermé* à un état *ouvert* :

$$\frac{dN_B}{dt} = k_{AB}^{th} e^{F\Delta x_{AT}/kT} - k_{AB}^{th} e^{(\Delta\nu_{AB}-F\Delta x_{TB})/kT}, \quad (2.4)$$

où  $k_{AB}^{th}$  correspond à la fréquence (statistique) de transition d'un état *fermé* à un état *ouvert* de la liaison,  $\Delta x_{AT}$  et  $\Delta x_{TB}$  la distance à parcourir pour passer d'un état fermé à ouvert, respectivement et enfin  $\Delta\nu_{AB}$  la hauteur de la barrière d'énergie de la liaison. Cette transition d'état élémentaire est dépendant de la vitesse d'étirement  $\dot{L}$  au delà d'une vitesse seuil  $\dot{L} < \dot{L}^*$ . Lorsque la vitesse d'étirement est en dessous du seuil, il vient :

$$F_{UC}(\dot{L} < \dot{L}^*) = \frac{\Delta\nu_{AB}}{\Delta x_{AB}}, \quad (2.5)$$

où  $\Delta x_{AB}$  est la longueur de la liaison (soit  $\Delta x_{AT} + \Delta x_{TB}$  vu en équation 2.4). Cette équation décrit le niveau de force de la région *II* d'un pili en phase de déplieement à vitesse d'étirement inférieure à la vitesse seuil.

Pour des vitesses supérieures au seuil,  $\dot{L} > \dot{L}^*$ , il vient [30] :

$$F_{UC}(\dot{L} > \dot{L}^*) = \frac{kT}{\Delta x_{AT}} \ln \left( \frac{\dot{L}}{\dot{L}^{th}} \right), \quad (2.6)$$

avec  $\dot{L}^{th}$  la vitesse d'étirement d'une liaison  $k_{AB}^{th}\Delta x_{AB}$ . A partir de l'équation 2.6, il est possible de prédire la vitesse seuil  $\dot{L}^*$  :

$$\dot{L}(F) = \dot{L}^{th} e^{F\Delta x_{AT}/kT} \quad (2.7)$$

Le comportement d'un pilus lorsqu'il est étiré à une vitesse constante, puis maintenu en position, subit des réorganisations internes pouvant être suivies sur le spectre de force (figure 2.12B), appelé ici essais de relaxation. Sur la figure, on peut noter que les pili de type P et S relaxent bien plus vite que les pili de type 1 (typiquement inférieur à la seconde et de l'ordre de la dizaine de seconde, respectivement). Cette dépendance temporelle de la force de déplieement est modélisée à partir des équations citées précédemment :

$$\frac{dF_{UC}(t)}{dt} = -\dot{L}^{th}\kappa \left[ e^{F_{UC}(t)\Delta x_{AT}/kT} - e^{\Delta\nu_{AB}-F_{UC}(t)\Delta x_{TB}/kT} \right], \quad (2.8)$$

avec  $\kappa$  la constante de raideur du piège optique. Ainsi, en modélisant les spectres cinétiques obtenus par les essais de relaxation, il est alors possible de déterminer les constantes moléculaires décrivant les liaisons  $LL$  d'un pilus et ainsi son comportement biomécanique, à savoir la longueur de liaison  $\Delta x_{AT}$  et la fréquence de transition de changement d'état  $\Delta\nu_{AB}$ .

Au cours de mon séjour post-doctoral, je me suis intéressé à la caractérisation biomécanique de pili de type S, exprimés par des isolats cliniques et issus de cas de méningites néonatales (NMEC, isolat : IHE3034) et de pyélonéphrite aiguë (UPEC : isolat 536), et également exprimés par des souches transformées de laboratoire HB101 pour contrôler leur production. Tel que décrit précédemment lors de la présentation du modèle, lorsqu'un pilus individuel est étiré, une courbe de force en fonction de l'élongation est mesurée avec un profil spécifique (Fig.2.12A, C), passant successivement d'une région *I*, *II* puis *III*. Il été démontré que ce processus est parfaitement réversible, sans hysteresis dans la phase de repliement [32] dans le cas des pili de type P.

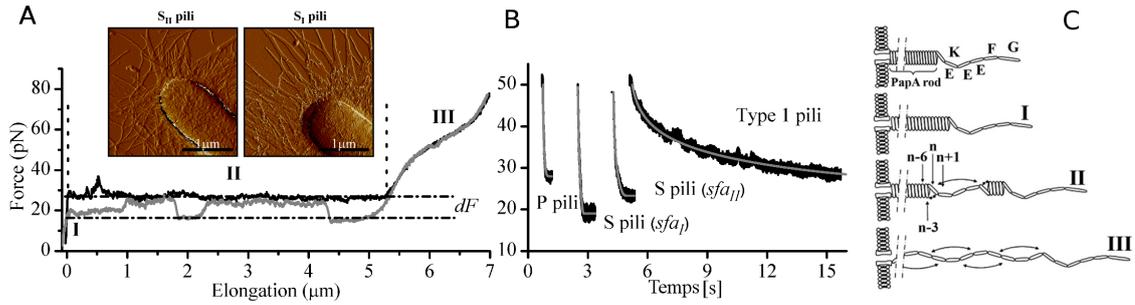


FIGURE 2.12 – (A) Spectre de Force en fonction de l'élongation de pili S<sub>II</sub>, typique du dépliement de l'hélice, caractérisé par ses trois régions. Ici, la région II n'est pas totalement réversible, *i.e.* lors du repliement, une différence en force  $dF$  est observée. Les clichés AFM représentent sur chacun une bactérie exprimant les pili de type S<sub>I</sub> et S<sub>II</sub> (gènes *sfaI* et *sfaII*, respectivement). (B) Essais de relaxation : le pilus est étiré à une vitesse de 40 μm/s, puis maintenu étiré. La force décroît d'un niveau à un autre très rapidement (P, S<sub>I</sub>, S<sub>II</sub>) ou lente (Type 1) (C) Modèle de l'hélice avec ses trois configurations caractéristiques (Région I, II, et III correspondantes à la partie A).

L'implication du gène *sfaX* dans la biogénèse de pili de type S a pu être démontrée [34]. *sfaX* est un gène situé dans le cluster d'expression de ce type de pili et serait responsable de la régulation de l'expression de pili de type 1. Il a pu ainsi être observé que les pili de type S ont des comportements similaires aux pili de type P [35], souvent la cause de pyélonéphrite. Cependant, la figure 2.12A montre que lors de la phase de repliement, la région II peut avoir deux niveaux de forces différents. En effet, les pili de type S ont une empreinte biomécanique particulière et permettent de supposer qu'il puisse exister deux conformations possibles lors du repliement. De plus, lorsqu'un pilus est étiré de manière rapide (ici 40 μm/s), *i.e.*, en régime dynamique, puis maintenu déplié pendant un temps spécifique, la force décroît jusqu'à un niveau d'équilibre. La figure 2.12 indique que les pili de Type 1 relaxent en environ 7 s, tandis que ceux de type P ou S en quelques centaines de millisecondes. Ce comportement suppose l'éventuelle influence de forces externes mises en jeu, en termes de contrainte de cisaillement au sein de l'uretère et de la vessie. Par ailleurs, l'originalité de cette étude réside également dans le fait qu'elle a pu être entreprise sur des isolats cliniques, démontrant i) que la technique d'expression d'un gène «sauvage» par une souche de laboratoire est probante et ii) la manière dont la souche clinique est cultivée, joue un rôle crucial dans le phénotype ; nous avons ainsi démontré que *E. coli* (IHE3034) provenant d'un nouveau-né souffrant de méningite, exprime le type S<sub>II</sub> lorsque la souche est cultivée sous agitation mais exprime le Type 1 quand elle est cultivée en condition statique. Ceci montre que l'environnement de l'hôte induit une réponse phénotypique visant à optimiser les organelles produits.

Ces **outils biophysiques** ont permis d'apporter une nouvelle compréhension dans la structure des pili (spécifiquement ici de type S) et de leur comportement biomécanique, permettant de corréler leur capacité à dissiper l'énergie fournie par les forces *in vivo*, ici, celles exercées par l'écoulement urinaire. Les pili S, bien que similaires aux pili P, largement étudiés [30-32], diffèrent par l'existence d'un double niveau de force en *région II* lors du repliement. On pourrait penser à deux conformations possibles.

Pour répondre à cette observation, un travail préliminaire a pu être initié en collaboration avec Uwe SAUER (Plateforme *Protein Expertise*, Umeå University) et Gunther Stier (Max Planck Institute, Heidelberg) : deux plasmides responsables de l'expression de pili de type S ont été purifiés (issus de deux isolats cliniques). Le peptide signal a été identifié ainsi que l'extrémité N-terminale (contenant le brin donneur). La séquence d'un pilus à deux pilines a été créée. Ce travail n'a pas été achevé suite à mon départ pour Toulouse, mais une perspec-

tive envisagée était ensuite d'exprimer cette séquence en marquant au  $^{15}\text{N}$  pour une analyse dynamique en RMN<sup>2D</sup>.

Nous avons vu que les souches uropathogènes *Escherichia coli* expriment plusieurs type de pili selon s'ils sont impliqués dans des infections urinaires au niveau de la vessie (pili de type 1), ou rénal (pili de type P et S). En collaboration avec Bernt Eric Uhlin (Department of Molecular, Umeå University), nous avons pu également mettre en évidence un troisième type de pili trouvés dans la région du rein, **les pili de type F1C**. Ce travail entre dans le cadre du stage de Master de Sarah Ehlers que j'ai supervisé et suit la même routine de caractérisation en spectroscopie de force à l'échelle de la Molécule Unique<sup>3</sup> développée précédemment. Le projet sur les pili de type F1C ouvre une réflexion particulière sur la capacité d'adaptation d'*E.coli* à exprimer des structures protéiques de surface permettant d'optimiser son attachement aux surfaces endothéliales et *in fine* à remonter le tractus urinaire vers l'hôte (circulation sanguine). En effet, il a pu être démontré lors de l'étude sur les pili de type S [35] qu'une homologie de la séquence primaire très marquée existait entre des isolats cliniques prélevés dans la région du rein  $S_I$  avec ceux de la région méningée (pili de type  $S_{II}$ ). Dans la cadre de l'étude de la biomécanique des pili F1C et son implication dans le processus d'adhésion et donc d'infection, les expériences SMFS ont montré qu'en faisant varier la vitesse d'étirement (de 100 nm/s à 64  $\mu\text{m/s}$ , **ce type de pili relaxait bien plus vite** que les pili de type 1, reflétant *a priori* leur environnement (rein *vs.* vessie). La figure 2.13a illustre les différents niveaux de force en régime dynamique pour des vitesses au dessus de la vitesse seuil. Il est ici observé que la processus de dépliage/repliage est réversible pour des régimes inférieurs à la vitesse seuil (courbe noire et grise). La figure 2.13b propose une analyse spectrale dynamique<sup>4</sup> [30] consistant à quantifier le niveau de force  $F_{UC}$  en *région II* pour différentes vitesses d'étirement et le modéliser avec l'équation 2.7 et déterminer la vitesse seuil  $\dot{L}^*$  (figure 2.13c).

Cette étude a également permis de rassembler les différents types de paramètres décrivant leur comportement biomécaniques afin de les comparer. A cette issue, il est alors possible de déterminer le type de pili exprimé par une souche sauvage d'*E.coli* et de prédire sa provenance dans le tractus urinaire.

Ce travail sur les pili d'*E.coli* a fait l'objet des articles [A5-7,12,13](#) et des communications [C5-8](#), [P1,2](#), et [S2,19](#).

Enfin, un important développement technique a été nécessaire : une deuxième instrumentation de pince optique a été entièrement conçue, avec l'aide des étudiants M2 Johan et Daniel Zakrisson pour réduire les aberrations sphériques et coma sur le dispositif optique (faisceau fibré 808 nm) et une optimisation a été apportée sur le programme d'acquisition en LabVIEW<sup>TM</sup> pour gagner en résolution spatiale et temporelle lors de la calibration par la méthode du mouvement brownien (cf. Eq.2.3). Nous avons pu ainsi exploiter deux systèmes de pinces optiques en simultanément sur la plateforme Biophotonique dont j'avais la responsabilité. Cette opportunité a permis d'engager d'autres études de spectroscopie de force présenté en section suivante.

### 2.3.2 Biomécanique des pili chez les *Streptococci*

Les pili exprimés par les souches pathogènes à Gram-positif ont été reconnus comme étant l'un des médiateurs fondamentaux de l'adhésion aux cellules eucaryotes [36], causant un taux de mortalité dramatiquement important dans le monde. Contrairement aux pili produits par les Gram-négatifs, ces structures sont encore peu étudiées en termes d'architecture moléculaire et de mécanismes dans le processus d'infection. *Streptococcus pneumoniae*, bien que commensal chez l'homme, est un pathogène opportuniste qui envahit de manière asymptomatique le

3. Pour rappel : SMFS : Single-Molecule Force Spectroscopy

4. DFS : Dynamic Force Spectroscopy

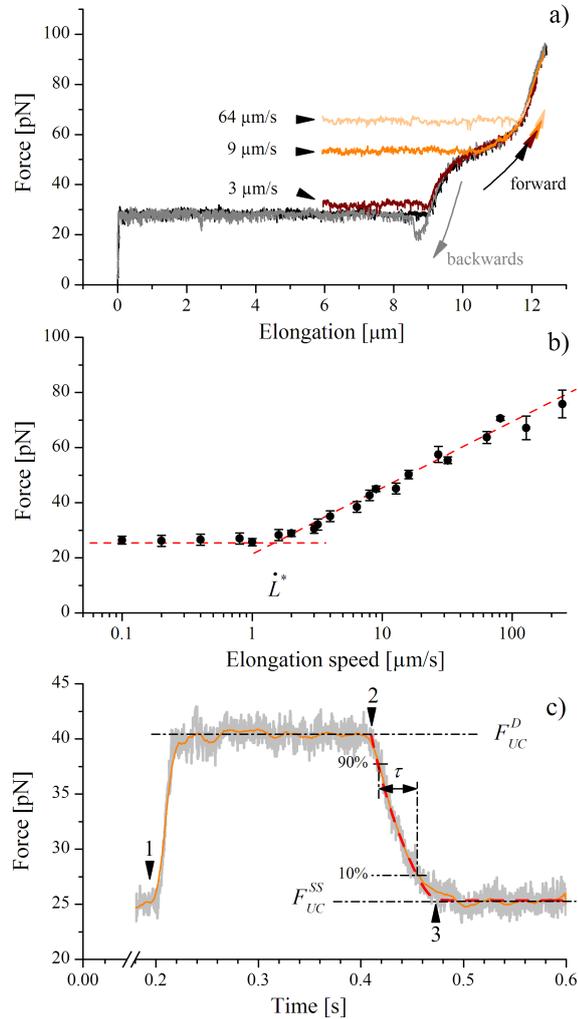


FIGURE 2.13 – **a.** Spectre de force (force vs. élongation obtenu à  $100 \text{ nm/s}$ , inférieure à la vitesse seuil; courbes noire - aller et grise -retour). Les autres courbes de couleurs correspondent à l'élongation du même pilus à des vitesses supérieures, jusqu'à la *région III*. **b.** Analyse spectrale (DFS) la force de dépliage en *région II* en fonction de la vitesse d'étirement. Chaque point est la moyenne de 3 à 15 expériences. L'intersection entre les deux régressions linéaires correspond à la vitesse seuil  $\dot{L}^*$  et est également modélisée par l'équation 2.7. **c.** Essai de relaxation d'un pilus soumis à une force d'étirement opérée à une vitesse supérieure à  $\dot{L}^*$  sur une distance typique de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$ . Étape 1 : Le pilus est étiré à la vitesse imposée. Le niveau de force  $F_{UF}^D$  correspondant est atteint et suit un plateau tant que le pilus est étiré. Étape 2 : Le système s'arrête et le niveau de force recouvre son état  $F_{UF}^{SS}$  d'équilibre à l'étape 3. La courbe en pointillée rouge est modélisée par l'équation 2.8 pour obtenir les constantes de longueur de liaison  $\Delta x_{AT}$  et la fréquence de transition de changement d'état  $\Delta \nu_{AB}$ .

nasopharynx, puis les autres organes des voies respiratoires, pouvant causer de graves otites, infections pulmonaires, pneumonies et méningites entraînant le plus souvent la mort chez le nourrisson (plus de 1,5 million par an dans le monde). *Streptococcus pyogenes* fait partie de la famille des streptocoques A, connus pour infecter la peau (impétigo), la gorge et provoquer des fasciites nécrosantes. Comme les pneumocoques, cette souche n'est pathogène que pour l'homme. *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* expriment des pili par un assemblage de sous-unités pilaires, liées de manière covalente les unes aux autres au moyen de transpeptidases, contrairement aux pili de bactéries Gram-négatif. Ces pili sont reconnus pour être impliqués dans la virulence, notamment du fait qu'ils trouvent une affinité avec un grand nombre de récepteurs de l'hôte. Ceci leur confère une importance majeure dans l'élaboration des vaccins [37, 38]. Peu de données sont accessibles dans la littérature au sujet de la structure de ces pili et de leur pouvoir pathogène. Cependant, l'apport d'un outil biophysique, tel que la spectroscopie de force sur molécule unique, permettrait d'apporter une meilleure connaissance sur la structure intrinsèque d'une telle architecture, lorsqu'elle est soumise à une contrainte externe, comme c'est le cas *in vivo*.

Dans une configuration similaire à celle employée avec les pili sur *E. coli*, une bactérie issue d'un milieu de culture de gélose au sang est suspendue dans une solution tampon de PBS 1x avec des billes PS1 (figure 2.11). La méthodologie est ensuite identique à celle employée avec *E. coli*.

La souche *S. pneumoniae*, BHN155, utilise l'îlot génomique *rlrA* de l'isolat clinique TIGR4 codant pour l'expression de pili appelés ici T4 [39]. Les mesures effectuées sur ces pili ont permis de mettre en évidence la nature et le comportement de ce type de biopolymère. La figure 2.14 représente une courbe typique. La force croît très faiblement jusqu'à une certaine distance (en général  $\approx 0,7 \mu\text{m}$ ) puis augmente très fortement pour atteindre les limites en force de rappel du piège optique, à savoir ici 120 pN pour une puissance de laser de 1 W. Ce type de comportement biomécanique est typique des polymères dits *vermiformes*. Un modèle courant pour décrire la réponse force-élongation des polymères linéaires lorsqu'ils sont soumis aux fluctuations thermiques est le modèle Worm-Like Chain (WLC) [40, 41]. Ce modèle décrit le polymère comme une chaîne flexible continue de longueur totale  $L_c$  (nm) avec une rigidité à la flexion, souvent exprimée en termes de longueur de persistance,  $L_p$  (nm). Comme il n'existe pas de solution analytique au modèle WLC pour toute la gamme des forces, des solutions approximatives ont été développées [18]. L'approximation la plus courante est la WLC interpolée, dérivée par Bustamante *et al.* [40], qui se lit comme la force  $F$  en fonction de l'élongation  $L$  du polymère :

$$F(L) = \frac{kT}{L_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{L}{L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{L}{L_c} \right], \quad (2.9)$$

avec  $L_p$  la longueur de persistance (nm) et  $L_c$  la longueur de contour (nm). Les résultats obtenus sur ce type de pili montrent que lors de l'étirement, le pilus gagne en longueur de contour  $L_c$  et conserve ses propriétés de flexibilité, c'est-à-dire une valeur de longueur de persistance  $L_p$  constante. Des cycles de mesure sur un même pilus ont été effectués, et démontrent qu'au-delà d'une valeur de force seuil, une dissipation d'énergie de type hysteresis est observée (figure 2.14). Le comportement biomécanique révèle que les pili T4 n'absorbent pas l'énergie aussi efficacement que la structure hélicoïdale d'*E. coli* lors de son dépliement.

Ces différences majeures soulèvent certaines questions :

- Comment ces différentes architectures optimisent-elles l'adhésion en présence de forces *in vivo* ?
- Quelles sont leur rôle dans la stratégie d'invasion de l'hôte ?

En présence d'une contrainte externe, les pili d'*E. coli* se déplient séquentiellement, permettant à chaque ouverture de lien d'absorber l'énergie, qu'en est-il de ce type de structure ? Alegre-Cebollada *et al.* [42] ont proposé une hypothèse chez *S. pyogenes* : les monomères sont

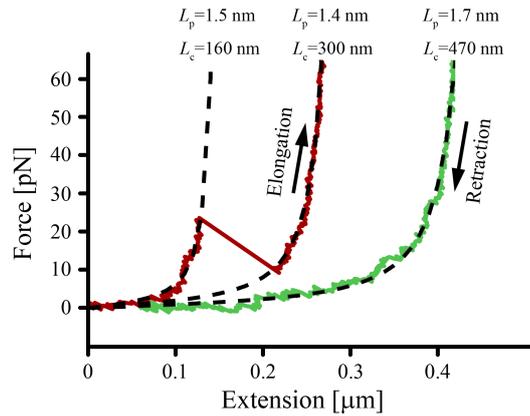


FIGURE 2.14 – Spectre de force de pili T4 de *Streptococcus pneumoniae*. La courbe rouge indique la phase d'étirement et la courbe verte le retour. En pointillé noir, le modèle WLC ajusté à partir de l'équation 2.9 permettant de déterminer les longueurs de contour  $L_c$  et de persistance  $L_p$  pour chaque segment.

tous assemblés en ligne par des liaisons covalentes (action enzymatique par des sortases) conférant au pili peu de possibilité d'extension mais chaque monomère est doté d'un pont isopeptide agissant comme un fusible mécanique qui rompt à 250 pN. Cette propriété mécanique donne la possibilité de dissiper l'énergie mécanique et encore une fois, comme pour *E.coli*, de minimiser l'impact sur le point d'ancrage. On pourrait assez facilement faire l'analogie avec les techniques d'escalade en cascade de glace : le point d'ancrage - une broche à vis - restant fragile, est sécurisé par des sangles repliées et cousues sur elles-mêmes. En cas de chute, ce sont les coutures qui lâchent, puis la sangle qui se déplie puis la broche, minimisant ainsi l'effort sur le point d'ancrage.

Le rôle mécanique des pili est encore mal connu, mais les conditions d'invasion sont différentes ; la capacité de la bactérie à former un biofilm, les propriétés du mucus (tractus urinaire *vs.* pulmonaire) et les propriétés du fluide (urine/sang *vs.* air, 1000 fois moins dense). Pour différents milieux *in vivo*, il semblerait que différentes stratégies soient utilisées, permettant *in extenso* d'aboutir au même résultat, c'est-à-dire, le prolongement de la tâche infectieuse.

Dans le cadre de ce projet, j'ai pu initier deux collaborations importantes avec Birgitta Henriques-Normark (Karolinska Institute, Stockholm) avec *S. pneumoniae* et Emmanuelle Charpentier (Dept. Molecular Biology, Umeå University) avec *S.pyogenes*. Ce travail a fait l'objet des publications [A4](#), [A12](#), [A13](#), et des communications [C5](#), [C7](#), [C8](#), [P2](#) et [S2](#).

## 2.4 Mécanismes d'interactions flore microbienne/aliment/mucus intestinal : application aux bactéries lactiques

*Chargé de recherche CR2 à l'INRA - département CEPIA, dans l'équipe Génie du Métabolisme des Procaryotes au LISBP - Période 2010-2014*

J'ai intégré l'équipe MICA/CEPIA du Génie du Métabolisme des Procaryotes (GMP) coordonnée initialement par Pascal Loubière (DR2 INRA) en Novembre 2010 au LISBP pour renforcer la thématique sur la muco-adhésion des bactéries lactiques (BL) animée jusqu'alors par Muriel Mercier-Bonin (CR1 INRA CEPIA). Cette action se positionnait dans le programme prioritaire INRA CEPIA *Modaltub* autour de la *compréhension et de la modélisation du devenir de l'aliment dans le tube digestif*. Ce projet de recherche s'articulait autour de la thématique de la *compréhension mécanistique et multi-échelles des interactions microbio-te/mucus intestinal avec une application aux BL*. Depuis mon recrutement, mes activités de recherche se sont orientées essentiellement vers l'obtention d'une carte détaillée du processus

d'interactions BL/mucus (adhésion et migration) par le développement d'outils et d'approches biophysiques. Plusieurs volets ont été abordés, à savoir :

- **Tâche 1** : Caractérisation de la muco-adhésion sur des surfaces abiotiques
- **Tâche 2** : Étude de la migration d'espèces biotiques et abiotiques dans le mucus
- **Tâche 3** : Caractérisation de la muco-adhésion sur des lignées cellulaires mucipares

La couche de mucus est généralement décrite comme un gel visco-élastique semi-perméable permettant la diffusion puis l'accès des nutriments, via l'épithélium, au système circulatoire et aux organes cibles. Ses propriétés gélifiantes sont notamment dues à la présence des mucines, glycoprotéines de haut poids moléculaire [43]. Cette couche, même si elle évolue en nature et structure, est présente tout le long du tube digestif, de la bouche jusqu'au côlon. Au niveau microbien, le mucus joue à la fois le rôle de niche pour les bactéries commensales et de barrière contre les espèces pathogènes [44]. Les mécanismes de rétention associés peuvent être mécaniques (effet barrière), nutritionnels (sources carbonées endogènes ou exogènes) ou physico-chimiques [45, 46]. Contrairement aux espèces pathogènes, les phénomènes mis en jeu dans l'implantation et le maintien de la flore « positive », comme les BL, dans le tractus gastro-intestinal restent peu explorés, notamment en termes de processus d'interaction et de transfert au sein du mucus. Face aux enjeux actuels de santé et de sécurité sanitaire pour l'élaboration d'aliments fonctionnels à visée « bio-thérapeutique », le projet CR que j'ai conduit jusqu'en 2014-2015 s'attachait à étudier les mécanismes physico-chimiques et moléculaires impliqués dans les interactions - biotiques et abiotiques - des BL avec la barrière intestinale, vu sous l'angle de l'un de ses constituants-clés, **le mucus**.

*Lactococcus lactis* est l'un des microorganismes les plus ingérés par l'Homme via les aliments fermentés. En outre, de nouvelles applications à visée thérapeutique consistant à délivrer au niveau des muqueuses des vecteurs vaccinaux sont en cours de développement [47]. De plus, *L. lactis* est reconnue comme la bactérie lactique modèle. Plusieurs souches ont leur génome séquencé, et la biodiversité de l'espèce permet de disposer d'un panel de souches différentes quant à leurs propriétés d'adhésion. Enfin, l'équipe GMP possède une expertise reconnue sur la physiologie et le métabolisme de cette espèce, notamment via l'étude de son comportement en conditions de fermentation définies face à un stress identifié ou en conditions complexes telles que dans des matrices alimentaires. Une partie importante des études est menée dans le cadre d'une activité récurrente visant à caractériser le comportement des bactéries lactiques au sein de différents environnements, en particulier grâce à l'analyse transcriptomique. L'utilisation de souches de *L. lactis*, à défaut d'utiliser un certain nombre d'autres espèces moins connues ou moins facilement analysables, se justifie pleinement par la capacité d'acquérir, par analyse de biologie intégrative (transcriptome, protéome, traductome, stabilome), une vision globale de sa réponse adaptative à la muco-adhésion.

**L'objectif central du projet est d'obtenir une carte détaillée du processus d'interactions BL/mucus sur le plan de l'adhésion/migration.**

J'ai bénéficié d'avancées réalisées sur un panel de souches muco-adhésives (collaboration Institut MICALIS de Jouy-en-Josas) pour lequel les déterminants moléculaires et physico-chimiques de la muco-adhésion avaient été identifiés dans le cadre de la thèse de D.T.L. Le (2011)[48], et explorés plus amplement avec la thèse de T.-L. Tran que j'ai co-encadré (2013) [49].

Par ailleurs, ce travail a été soutenu par le département CEPIA via l'Action Incitative Concertée INTERLAC, et via le financement pour équipements mi-lourds suite à mon recrutement, tous deux obtenus en 2010 ainsi que d'un financement Bonus Qualité Recherche INSA obtenu en Juin 2011 dans le cadre du projet « Interaction Bactéries Lactiques / Mucus Intestinal : approche expérimentale et numérique » en collaboration avec l'Institut de Mathématiques de Toulouse (Philippe Poncet) et l'équipe Transfert-Interface-Mélanges (TIM) avec Philippe Schmitz du LISBP. Enfin, une Action Nouvelle Soutenue CEPIA (2011 et 2012) a permis de financer et soutenir le projet « Caractérisation des propriétés biomécaniques et

muco-adhésives des pili de *Lactococcus lactis* par pince optique ». Cette partie sera développée en section 2.5.

### 2.4.1 Caractérisation de la muco-adhésion sur des surfaces abiotiques

L'objectif de ce projet est d'alimenter notre compréhension des interactions entre *L. lactis* et les mucines, en caractérisant les déterminants moléculaires de la bactérie impliqués. Comme mentionné précédemment, des travaux récents (thèse D.T.L. Le [48], thèse T.L Tran [49]), réalisés en collaboration entre le LISBP (équipe GMP) et l'Institut MICALIS (Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier), ont montré que les pili et des protéines de surfaces de type Mucus-Binding (MUB) participent à la muco-adhésion. Dans ce cadre, la collaboration mise en place avec l'Institut Micalis nous a permis d'avoir accès à des souches recombinantes chez *L. lactis* ssp. *lactis* afin de démontrer sur la mucine modèle (Pig Gastric Mucin, PGM), le rôle fonctionnel des pili et MUB dans la muco-adhésion.

Des essais en chambre à écoulement ont été menés dans le cadre de la thèse de Thi-Ly Tran [49] et d'une collaboration avec Marie-Pierre Chapot-Chartier (MICALIS). Cette collaboration nous donne accès à plusieurs souches intéressantes de *L. lactis* nous permettant de connaître l'influence de protéines de surface dans la muco-adhésion. Ainsi, deux types de protéines ont été mis en évidence, les pili et les protéines à domaines MUB (Mucus-Binding). Par délétions successives, nous avons pu tester des souches exprimant les pili et une protéine MUB, puis les pili seuls, la protéine seule et un contrôle négatif. Ces essais ont pu mettre en évidence le rôle des pili et de la protéine MUB dans l'adhésion sur des surfaces fonctionnalisées avec des mucines. Il apparaît que les souches exprimant les deux types de protéines de surface adhèrent très fortement aux mucines tandis que les souches exemptes n'adhèrent pas du tout à ce type de surface. Ensuite, la présence seule des protéines MUB ou des pili ne suffit pas à obtenir une muco-adhésion aussi efficace que la combinaison des deux sur des surfaces fonctionnalisées au PGM. Des études parallèles ont déjà été effectuées en AFM dans le cadre de la thèse de D.T.L. Le (2011). Les bactéries sont immobilisées sur une pointe qui vient ensuite au contact d'une surface fonctionnalisée en mucines (figure 2.15A et D). Ces résultats montrent une même tendance qu'en chambre à écoulement, bien que le mode de contact et de détachement soit différent. Une information supplémentaire concerne la distance à la rupture, qui est bien plus longue avec les pili (600 nm environ) qu'avec les MUB [50] (figure 2.15C et F).

### 2.4.2 Étude de la migration d'espèces biotiques et abiotiques dans le mucus

Les propriétés rhéologiques du mucus intestinal sont un paramètre clé lorsqu'il s'agit de diffusion d'espèces en son sein. L'hypothèse émise est que les propriétés de surface de BL modulent leur capacité à migrer au travers, outre les propriétés visco-élastiques inhérentes au gel de mucus. Pour aborder cet aspect, on se place à l'échelle de la cellule, là où le mucus est un milieu discontinu constitué d'un réseau de protéines fortement glycosylées. L'objectif de ce volet consiste à caractériser la rhéologie du micro-environnement et la dynamique de migration d'espèces par le développement d'outils et de méthodologies adaptées.

Ce volet fait partie intégrante de la thèse de Thi-Ly Tran [49] soutenue en décembre 2013 pour qui j'ai pu développer une routine d'analyse MATLAB<sup>®</sup> en adaptant un algorithme de « particle tracking » et d'analyse statistique. La méthode de « Multi-Particle Tracking » (MPT) consiste à suivre la position de centaines de particules fluorescentes pour déterminer leur coefficient de diffusion et les propriétés mécaniques du fluide qui les suspend. Le fluide en question est une solution de mucines modèles, le PGM dont la concentration est fixée dans la gamme physiologique 0,5-5,0% (m/v). Pour caractériser leurs capacités diffusantes, une série de particules sphériques (billes) de polystyrène marquées a été sélectionnée pour une gamme de taille de 200 – 1000 nm. La surface des billes est chargée négativement (groupements carboxyle) ou positivement (groupements amine). Une fonctionnalisation au polyéthylène glycol

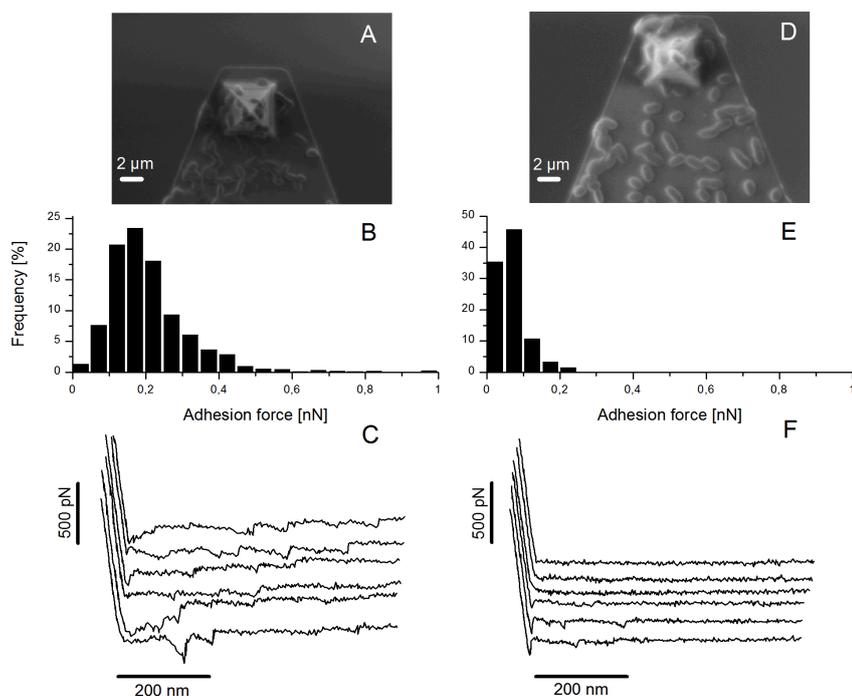


FIGURE 2.15 – **A** et **D** : Image en microscopie électronique à balayage de la pointe AFM sur laquelle sont fixées des souches de *L. lactis*. **B** et **E** : Histogrammes des fréquences d’occurrence (%) pour des force d’adhésion (nN). **C** et **F** : Spectres de force. Souches TIL448 (A-C) exprimant des pili et des protéines à domaines MUB et TIL1230 (D-F) curée de plasmides et n’exprimant ni pili ni MUB à sa surface pour contrôle.

(PEG) permet de neutraliser la charge. Avec ces trois paramètres (taille et charge des billes, concentration en PGM) une série d’expériences a permis de conclure que la migration de billes est fortement ralentie par la charge, quelle que soit la taille. Lorsque la taille caractéristique du maillage se réduit, par l’augmentation de la concentration, l’effet de la taille de la bille devient alors significatif. En effet, l’augmentation de la concentration revient à densifier le réseau de mucines et obstrue le passage d’une bille à taille fixée comme c’est le cas sur la figure 2.16A. A noter que la distribution en taille est de type log-normale avec une distribution multimodale pour les cas à concentration élevée, soulignant le caractère hétérogène du fluide. Dans le cas de concentrations extrêmes, ici 0,5% et 5,0%, les maxima d’occurrence de la diffusion apparente,  $D_a$  se situe vers des valeurs similaires mais leur modalité et étalement sont très différents. En effet, une bille neutralisée en charge (PEG, ligne noire pointillée, par exemple) sera piégée par le réseau de mucines mais aura néanmoins des possibilités de s’en échapper car soit ce réseau est dynamique, c’est-à-dire que la taille des pores semblent varier au cours du temps soit il présente une distribution de porosité représentée par celle de la figure 2.16A. De même, à faible concentration (PEG, ligne rouge pointillée), même si une partie est obstruée par le réseau, une autre proportion de billes semble diffuser presque librement, se rapprochant ainsi de la valeur de référence dans l’eau (pic bleu).

Par ailleurs, le coefficient de diffusion d’un traceur dans un fluide ici complexe n’est pas la seule information qu’on puisse obtenir. En effet, les propriétés rhéologiques du fluide sont intrinsèquement liées aux capacités de déplacement du-dit traceur. A partir du déplacement quadratique moyen (MSD), il est désormais possible de déterminer le module complexe du fluide. Cependant, deux méthodes ont été appliquées dans ce projet : la micro-rhéométrie dite « 1 point » qui se base sur l’autocorrélation du déplacement d’un traceur [51, 52] et la micro-rhéométrie dite « 2 points » qui se fonde sur la corrélation croisée entre deux traceurs séparés d’une certaine distance (3 – 100  $\mu\text{m}$ ) [53]. La limite de la première méthode, bien que

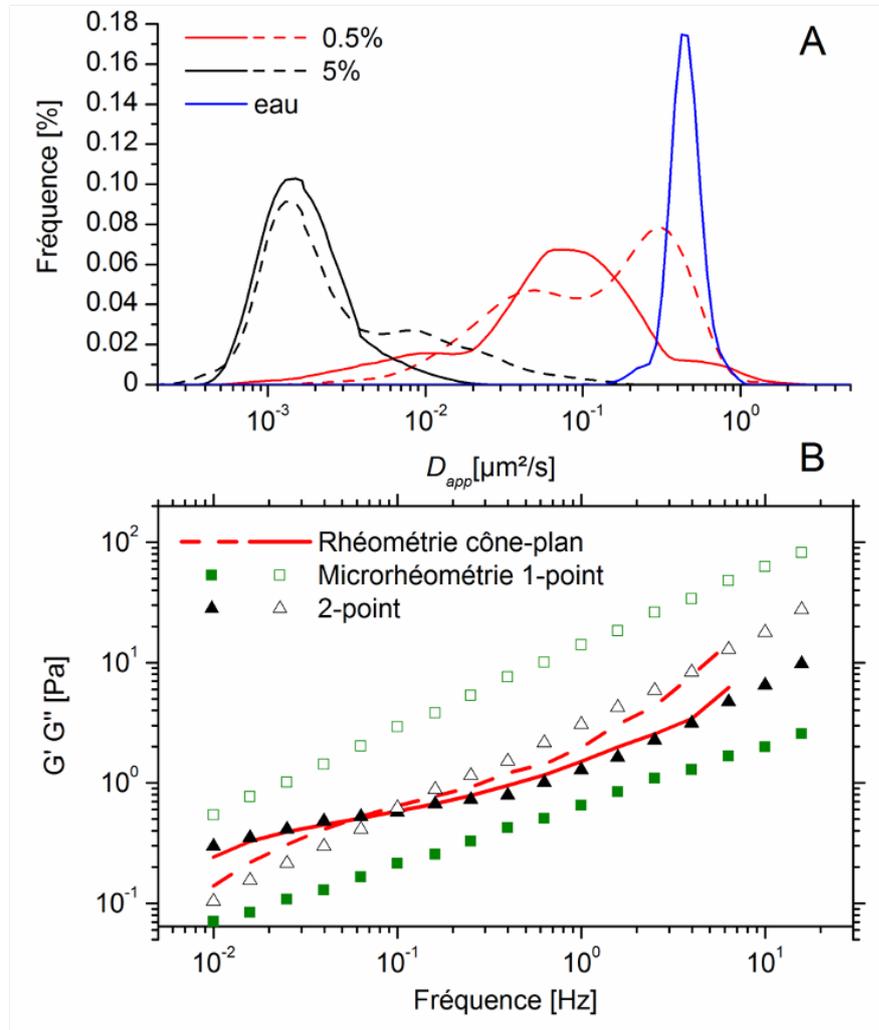


FIGURE 2.16 – **A.** Distribution des coefficients apparents de diffusion,  $D_a$  pour des billes de 500 nm de diamètre, carboxylées (ligne continue) ou PEGylées (ligne pointillée) dans du PGM à 0,5% (rouge) ou 5% (noir) en concentration (m/v). **B.** Module visqueux  $G''$  (symboles vides et ligne pointillée) et module élastique (symboles pleins et ligne continue) en fonction de la fréquence dans le cas de PGM 5% (m/v) en géométrie cône-plan (lignes rouges), micro-rhéométrie auto-corrélée (carrés) et à corrélation croisée (triangles) avec des billes de 500 nm PEGylées.

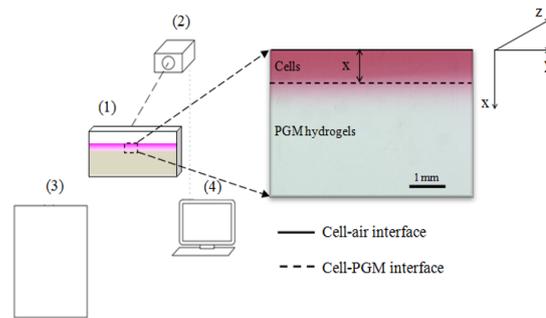


FIGURE 2.17 – Dispositif de suivi du front de diffusion  $x$  de souches de *L.lactis* dans un gel de mucus, confiné dans une cellule de Hele-Shaw (1), au moyen d’une caméra (2), d’un source lumineuse par mannequin LED (3) et d’un système d’acquisition (4).

très directe, est essentiellement basée sur l’hypothèse de l’homogénéité du milieu. La seconde n’a pas de limite (taille et forme du traceur, hétérogénéité) mais demande un calcul plus poussé. Sur la figure 2.16B, pour une concentration de 5,0 % en PGM, c’est-à-dire plutôt hétérogène (voir figure 2.16A), la micro-rhéométrie autocorrélée (1-point) ne décrit plus le comportement macroscopique mesuré par un rhéomètre rotatif (lignes rouges) et ne montre pas le croisement des modules  $G'$  et  $G''$ . En considérant que le mouvement d’un traceur influe sur le mouvement de son voisin, on obtient des valeurs très similaires à la « réalité » par corrélation croisée (2-point). Cette méthode, largement couverte dans la littérature, a pu être adaptée au laboratoire, et appliquée sur les gels de mucines porcines et murins [49].

Toujours dans le cadre de la thèse de Thi-Ly Tran, une méthode développée avec Nicolas Dietrich (Equipe TIM, LISBP) consiste à suivre le front de diffusion (DFT) d’un traceur dans un milieu et de déterminer le coefficient de diffusion de la population par la loi de Fick (Figure 2.17). Le milieu est placé dans une cellule de Hele-Shaw, soit deux plaques transparentes verticales et parallèles séparées de 2 mm. La suspension bactérienne, préalablement marquée, est injectée sur l’interface air-liquide, puis l’acquisition s’opère à intervalles de temps réguliers pour obtenir l’évolution temporelle de la position de cette population. L’analyse d’image se fait par un algorithme de type Monte-Carlo qui détermine très précisément la position du front de déplacement. Outre cette information, il permet également de s’assurer que le phénomène physique de diffusion (Fick) n’est pas biaisé par des phénomènes de convection ou de sédimentation (Figure 2.18). Les 4 souches (MUB+/pili+, MUB+/pili-, MUB-/pili+ et MUB-/pili-) ont été testées et confirment les résultats obtenus en chambre à écoulement. Ainsi, les souches délétères migrent plus rapidement que les autres indiquant que la contribution MUB/pili freine la diffusion et favorise la persistance. Les souches MUB et pili diffusent moins vite que les souches MUB/pili, ce qui montre encore une fois que c’est la combinaison des deux qui augmente le degré de persistance dans le tractus intestinal.

### 2.4.3 Caractérisation de la muco-adhésion sur des lignées cellulaires mucipares

Ce volet consistait à implémenter les méthodes développées plus haut (muco-adhésion/interaction et microrhéologie/diffusion) sur des supports *in vitro* au moyen de lignées cellulaires mucipares. L’approche *in vitro* de l’adhésion bactérienne présente l’avantage de pouvoir mener des investigations sur un mucus proche de la configuration *in vivo* car il n’a subi aucun changement physiologique, aucune séparation de phase ni aucun désordre dans sa structure entre le prélèvement et l’expérience. La quantification *in situ* des interactions BL/mucus est primordiale.

Un objectif à court terme a été de mettre en œuvre un tapis cellulaire muco-sécréteur dans une chambre dédiée et soumis à écoulement cisailé. La prise en charge de ce volet sous-

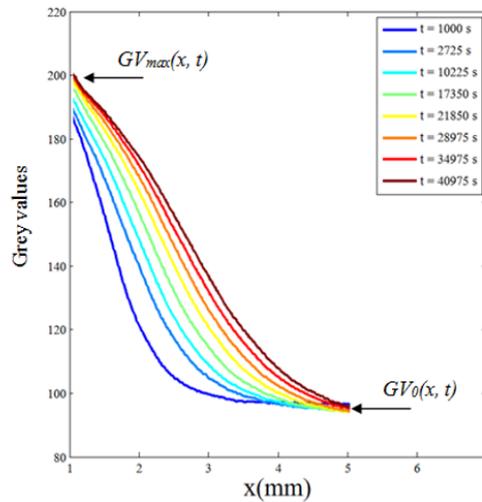


FIGURE 2.18 – Profils  $GV$  de front de diffusion de la souche TIL1290 dans du PGM 0.5 % en fonction de la distance parcourue  $x$  (mm) et du temps (couleurs de courbes), ici de 1000 s à 40975 s.

entendait la mise en place des modèles d'interaction par (i) le développement d'une chambre à écoulement cisaillé accueillant un tissu épithélial *in vitro*, (ii) l'acquisition de compétences spécifiques aux lignées intestinales (avec une phase préalable de formation, qui a été effectuée début 2011 à Toxalim – équipe de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition INRA AlimH (Vassilia Théodorou). Sur le plan de l'infrastructure, une salle dédiée à la culture cellulaire, classée au niveau de confinement L1 et potentiellement L2, a été conçue.

Des premiers essais ont été menés sur les lignées cancéreuses intestinales Caco-2, toutefois non muco-sécrétrices, pour mettre au point et fiabiliser la démarche expérimentale (contrôle des paramètres opératoires tels que le taux d'ensemencement, la durée entre deux passages et la vitesse de prolifération). De nombreux échanges avec le Laboratoire Lyonnais de Recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition, Unité INSERM U1060/ INRA 1235/ Université-Lyon1/ INSA-Lyon, en collaboration avec Pascale Plaisancié) ont permis d'optimiser les protocoles de cultures. C'est courant juin 2012 que des premiers essais de mise en contact de bactéries lactiques avec les tapis cellulaires ont pu commencer. Des souches fluorescentes (coll. Jean-Christophe Piard, MICALIS) ont pu être mises au contact d'un tapis cellulaire et un écoulement cisaillé a été créé. Le dispositif d'écoulement (adapté pour un microscope inversé) a pu être obtenu grâce à la collaboration forte avec l'INSERM de Marseille (coll. Philippe Robert, médecin-chercheur, équipe Adhésion et Inflammation). A faible contrainte, le tapis cellulaire est stable et les souches non adhérentes sont rapidement éliminées par l'écoulement. En revanche, à contrainte plus élevée (3 Pa environ) le tapis commence à se détacher. Un traitement préalable avec des molécules « d'accroche » (e.g. fibronectine, collagène etc.) pourrait s'avérer une alternative intéressante.

Dans le cadre du projet Syndifrais « Etude du triptyque bactéries lactiques – mucus – inflammation : vers de nouveaux effets santé des bactéries lactiques ? » portant sur l'adhésion de lactocoques et streptocoques sur les lignées HT29-16E (profil intestinal) et HT29-MTX (profil gastrique), une série d'expériences consistent à mettre en contact les différentes souches avec les lignées dans des puits de culture. Après une série de rinçage, le surnageant est remis en culture sur boîte de Petri ainsi que le tapis cellulaire contenant les souches potentiellement adhérentes. Cette méthode est plus facile à mettre en œuvre que la chambre à écoulement spécifique, mais surtout elle permet de tester au moins 6 souches (ou répétitions) en même temps. L'idée du projet était de prendre en charge la partie lactocoques / HT29-16E. Une visite à l'institut MICALIS a permis de mettre en œuvre et synchroniser les protocoles.

Ce travail a été valorisé par des communications (C9-10, C12-13, C15 et P3).

Ce volet de mon activité CR2, à mon entrée à l'INRA / LISBP a engagé un très lourd développement méthodologique (culture de lignées et production de mucus), technique (construction d'un laboratoire L2), et fondamental (apprentissage des connaissances, acquisition de compétences spécifiques). C'est une inertie non négligeable qui n'a malheureusement pas été exploitée puisque cette activité a été arrêtée en 2013 suite au départ d'un chercheur de l'équipe GMP et une réorganisation de la stratégie scientifique, impulsée directement par le département CEPIA. C'est à cette période qu'il m'a été demandé par le département de changer d'équipe et de thématique. Néanmoins, cette expérience a été très enrichissante et a permis d'initier de nouvelles perspectives toutes aussi intéressantes.

## 2.5 Adhésion microbienne et biofilm

*Poste chargé de recherche CR1 à l'INRA/INRAE - département CEPIA/TRANSFORM), dans l'équipe Transfert-Interface-Mélange (TIM) au LISBP/TBI - Période 2014-2023*

Cette section est un continuum de la section précédente concernant le travail effectué sur les pili de *L.lactis*. Elle illustre les activités initiées (ou maintenues) depuis mon changement d'équipe [GMP (CR2)  $\Rightarrow$  TIM (CR1)] à TBI sur la compréhension des mécanismes de formation et structuration d'un biofilm.

### 2.5.1 Les phénotypes d'adhésion sont le reflet de la diversité génotypique de la sous-espèce *lactis* chez *L. lactis* pour le développement de biofilm positif dans la machine à traire

*Projet LACTAD (collaboration École d'Ingénieur de Purpan)*

**Contexte.** La sous-espèce *lactis* chez *L.lactis* a été déterminée par la proximité génotypique des différentes souches de *L.lactis* selon différents marqueurs métaboliques et génétiques. Initialement, les souches étaient simplement classées par leur origine laitière ou non laitière. Des travaux récents au LISBP [54] ont permis de montrer que leur classement pouvait être affiné par leur diversité génétique (6 loci choisis) et démontre une grande variabilité au sein de la sous-espèce en fonction de leur origine (ex. lait, sol, végétaux, fromages, produits carnés) et leur utilisation (ex. levains industriels). L'hypothèse générale est que ces souches en majorité indigènes ont donc initialement colonisé des surfaces diverses pour survivre. Certaines souches ont acquis des compétences : par exemple la souche végétale TIL448 est capable d'adhérer aux mucines par la production de pili et de MUB. Lorsqu'elle perd ses plasmides, elle perd le phénotype de muco-adhésion.

**Démarche et outils.** Pour apporter une meilleure compréhension du lien entre la diversité génotypique et le phénotype d'adhésion, un panel de souches indigènes toutes différentes sur le plan génotypique ont été caractérisées. Les principaux facteurs qui gouvernent l'adhésion initiale sont spécifiques (reconnaitances de récepteurs) et/ou non-spécifiques (interactions électrostatiques, acide-base de Lewis et Lifshitz - van der Waals) selon le modèle DLVO. Le support choisi est l'acier inoxydable 316L largement répandu dans l'industrie agro-alimentaire. La démarche consiste à caractériser la mobilité électrophorétique et l'hydrophobicité par une méthode d'affinité aux solvants polaires et apolaires. Ensuite, pour illustrer le champ d'application de biofilms positifs en milieu fromager, une recherche génétique et phénotypique de production de bactériocines a été entreprise pour inhiber la croissance de 4 souches représentatives de *Listeria monocytogenes* et de *Staphylococcus aureus*. Enfin, un nombre de souches de *L.lactis* sélectionnées selon leurs aptitudes ont été testées en chambre à écoulement cisailé pour déterminer leurs capacités d'adhésion.

**Résultats.** L'étude des capacités d'adhésion de ces souches indigènes avec une méthode hydrodynamique en chambre à écoulement cisailé [21] montre que certaines souches sont

performantes en termes d'adhésion sur l'acier inoxydable et présentent également l'avantage de produire des bactériocines qui inhibent la croissance du pathogène *Listeria monocytogenes*. Il est démontré que les capacités d'adhésion de ces souches ne sont pas simplement décrites par la physico-chimie de surface (hydrophobie et charge). Une recherche génétique montre que ces souches ne sont pas capables a priori de produire des pili mais des protéines MUB qui diffèrent légèrement du motif étudié sur la souche TIL448. L'application visée dans ce projet est de sélectionner un levain pour promouvoir la diversité génétique, par rapport à la domestication de levains industriels en sélectionnant des souches intéressantes capables d'adhérer et former des biofilms positifs en milieu lait cru (colonisation exclusive de surfaces, production d'anti-pathogène).

Ce projet est le fruit d'une collaboration entre l'école d'Ingénieurs de Purpan (EIP) avec Hélène Tormo (EIP) et Gwenaëlle Jard (EIP) et Marie-Line Mingot-Daveran (équipe GMP à TBI). Ce projet a permis l'encadrement de Cécile Philippe (M2 UPS) et Mélanie Rayme (M1 EIP).

Ce travail a été valorisé par les communications suivantes : C11, C16, P4-6, P9, P10, P13-14, P17.

## 2.5.2 Analyse nanomécanique des pili de *L.lactis* par Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique

**Contexte.** Il a été démontré que les pili sont un facteur primordial dans l'adhésion de *L.lactis* sur des surfaces abiotiques (polystyrène) et biotiques (mucines). La biogénèse des pili est une machinerie de sécrétion typique des souches à Gram positif qui fait intervenir des sortases, enzymes qui assemblent deux protéines élémentaire – les pilines – ensemble de manière covalente. Le pilus qui en résulte est un assemblage en série de piline de squelette (voir figure 2.19) – PilB chez *L.lactis* IL1403 – avec une piline de coiffe – PilA – en dernière position. Cet assemblage est uniquement réalisé par la sortase C (strC). Le pilus est fermement ancré au peptidoglycane par une piline d'ancrage – PilC – qui maintient le pilus à la surface du lactocoque.

En 2012, Oxaran et al. [55] publient un article sur le rôle fonctionnel des pilines qui constituent le pilus produit par la souche IL1403 de *L. lactis* spp. *lactis*. Ils démontrent que cette souche possède un opéron codant pour la synthèse de pili mais est incapable de les produire en conditions standards de culture. Cette équipe construit alors des souches recombinantes permettant la surproduction de pili mais aussi modulant l'architecture générale (Figure 2.19) en délétant l'expression de différents gènes de l'opéron codant pour la production des pili (*i.e.* *pilA*, *pilB*, *pilC* et *srtC*). Il a été démontré en conditions statiques que les pili jouaient un rôle dans l'auto-agrégation et la structuration du biofilm. Aussi, l'intervention de *srtC* et *PilB* était cruciale pour produire des pili natifs.

**Démarche et outils.** Pour comprendre en détail le rôle joué par les pili dans le processus de formation d'un biofilm, je me suis focalisé (coll. Jean-Christophe Piard (MICALIS)) sur l'influence des différentes pilines et de la sortase C sur (i) les propriétés d'adhésion sur une surface inerte et une surface fonctionnalisée par des mucines et (ii) les propriétés nanomécaniques des pili. Pour répondre au premier point, nous avons utilisé une chambre à écoulement cisailé (utilisée en articles A9-10) et une instrumentation de pince optique (A11) entièrement développée à façon pour la mesure en spectroscopie de force (expliquée en préambule technique).

**Résultats.** Les expériences menées en chambre à écoulement cisailée et en spectroscopie de force démontrent que *L.lactis* adhère de manière significative sur une surface abiotique, hydrophobe et chargée négativement selon trois conditions moléculaires et impérativement associées (Figure 2.19) : 1) production de pilines de squelette PilB, 2) utilisation fonctionnelle de la sortase C qui polymérise les PilB pour former des motifs répétés et

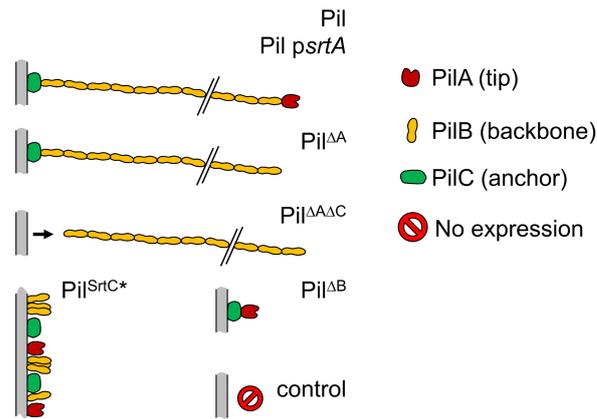


FIGURE 2.19 – Topologie des pili et souches utilisées. Le symbole  $\Delta$  correspond à la délétion d'un gène impliqué dans la production de l'élément suivant. Exemple :  $\Delta$ A : délétion de la piline A

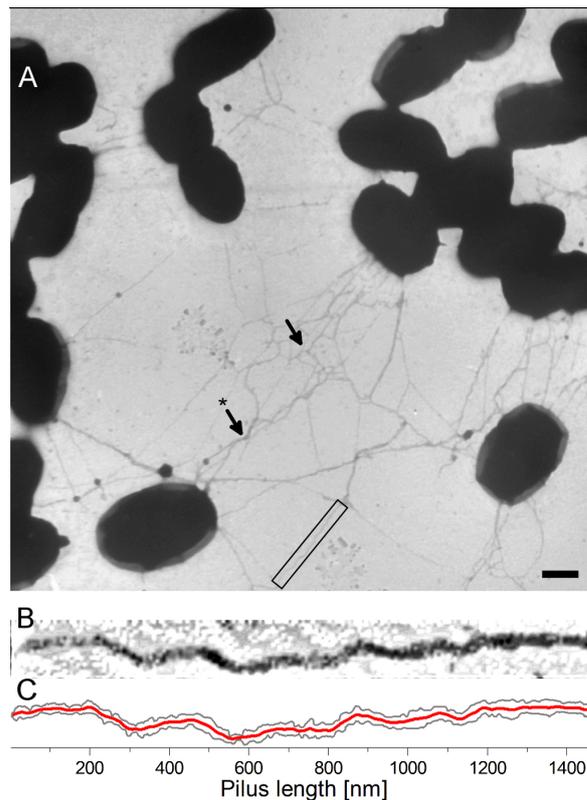


FIGURE 2.20 – **A.** Photographie par microscopie électronique à balayage de plusieurs bactéries *L. lactis* présentant un phénotype pilié. Les pili mesurent quelques nanomètres d'épaisseur et peuvent atteindre jusqu'à 3  $\mu$ m de long (flèches noires). **Barre d'échelle** : 500 nm. **B-C.** Une analyse d'image montre une importante flexibilité de ces pili.

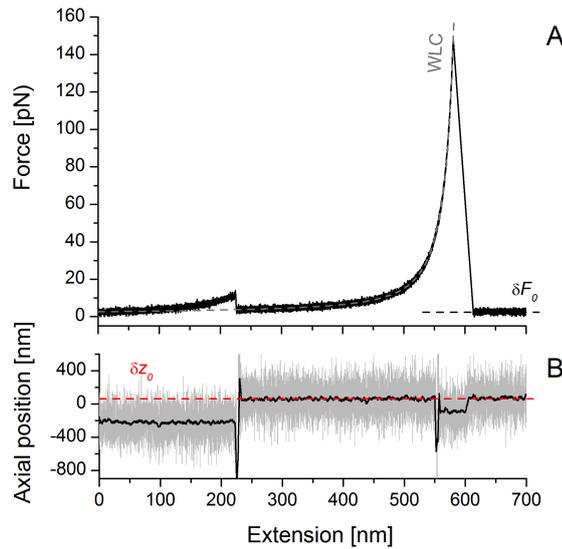


FIGURE 2.21 – **A.** Courbe expérimentale modélisée par WLC (equation 2.9) d'un pilus individuel en cours d'élongation (nm) lorsqu'il est soumis à une force transmise par une particule ( $1 \mu$  piégée optiquement). **B.** La position verticale de cette particule sonde est suivie en même temps pour s'affranchir de tout artefact de mesure et détecter un glissement du pilus sur la particule.

3) production de piline d'ancrage PilC. La piline de coiffe PilA ne joue a priori aucun rôle dans l'adhésion de ces souches aux surfaces étudiées. Ces pili ne présentent aucun domaine de reconnaissance de site connu lorsque mis en contact avec des mucines. Seuls des patches hydrophobes prédits dans la séquence de PilB (méthode HCA, collaboration Isabelle André à TBI) pourraient corroborer les observations de phénotype d'adhésion sur une surface hydrophobe [56]. Par ailleurs, les données de spectroscopie de force démontrent que la piline de coiffe PilC, nécessaire à l'ancrage du pilus sur la bactérie n'affecte pas l'architecture du pilus. En effet, la signature nanomécanique est uniquement révélée par la présence de motifs répétés et polymérisés de PilB. De plus, les courbes de force, interprétées par le modèle « Worm-Like Chain » (initialement présentée dans ce manuscrit sur les pili T4 de *S. pneumoniae* avec l'équation 2.9 en page 44) montrent que les pili natifs tout comme les chaînes polymérisées de PilB peuvent être décrits comme des polymères d'une extraordinaire flexibilité conférant au lactocoque une incroyable capacité à s'attacher aux surfaces et résister aux contraintes hydrodynamiques (voir une analyse graphique en figure 2.20B-C) et un exemple de mesure de force modélisée par WLC en figure 2.21A permettant par les deux méthodes de déterminer le paramètre de longueur de persistance  $L_p$ ).

L'article A11 [56] démontre également pour la première fois qu'il est possible de discriminer les interactions multiples entre une seule molécule (pilus) et plusieurs en se focalisant sur le suivi des paramètres de longueurs de contour et de persistance du modèle WLC. Enfin, tel qu'introduit en préambule technique sur la pince optique, j'ai développé une pince optique dédiée à la mesure de pili à l'échelle de la Molécule Unique pendant plus de trois ans pour réaliser ce travail. Il s'agit d'un système compact, optimisé pour notamment minimiser les aberrations sphériques, et le développement intégral d'une interface de contrôle homme-machine permettant le suivi en 3-D de la position de la particule-sonde et la mesure en temps réel (en 3-D aussi) de la force appliquée, calibrée par la méthode du mouvement brownien (Equation 2.3) pour des résolutions sub-pN et sub-nm. Ce dispositif encore amélioré à ce jour fera l'objet de perspectives dans la section "3.3.Lever les limitations aux transferts dans les bioréacteurs par des approches locales".

Ce travail sur la relation entre l'assemblage de pilines, l'adhésion des lactocoques sous

écoulement cisailé et la nanomécanique des pili a fait l'objet de deux articles h1A10 [56] et A11 [57].

### 2.5.3 Analyse des interactions homotypiques des pili de *L.lactis* par spectroscopie de force à l'échelle de la cellule

**Contexte.** Pour comprendre comment une communauté bactérienne, telle que le biofilm, s'organise et se structure, nous nous sommes penchés cette fois-ci sur les interactions qui peuvent intervenir entre deux cellules individuelles. Cette étude entre dans le cadre de la thèse MESR de Ibrahimia Dramé [58]. Nous avons pu mettre en évidence que les pili cités plus haut, jouent un rôle médiateur dans ces interactions. Les interactions entre deux cellules individuelles ont pu être mesurées à l'échelle du nanomètre et du picoNewton (1 millionième de millionième de Newton) au moyen de la microscopie à force atomique (AFM).

En collaboration avec Etienne Dague de l'équipe ELIA (Ingénierie pour les sciences du vivant) du LAAS-CNRS et de Jean-Christophe Piard et Marie-Pierre Chapot-Chartier de l'INRAe, AgroParisTech de l'institut MICALIS, nous avons utilisé les mutants cités plus haut (des deux partenaires) de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Les résultats publiés dans ACS Applied Materials & Interfaces (A16 [59]) permettent de mieux comprendre le rôle médiateur des pili dans la cohésion des cellules lors de la formation d'un biofilm de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sur des substrats biotiques ou abiotiques.

Nous avons vu précédemment que les pili et les protéines à domaine MUB (*mucus-binding protein*) jouent un rôle primordial dans les interactions entre les cellules de *L. lactis* et celles de la muqueuse intestinale. Par ailleurs, Oxaran *et al.* [55] observent que le biofilm est fortement réticulé et structuré lorsque *L.lactis* produit des pili. Enfin, nous avons vu en section précédente que les pili sont des protéines extrêmement flexibles, qui tentent à s'autoaggréger et adhérant aux mucines.

**Pour comprendre la formation et l'architecture du biofilm, nos investigations se sont portées ici dans les interactions homotypiques inter-cellules, et plus spécifiquement inter-pili qui seraient les briques élémentaires de cette architecture générale.**

**Démarche et outils.** Pour étudier l'hypothèse d'un rôle majeur des pili à l'échelle de la cellule unique, l'objectif, dans cette première partie des travaux de thèse, a été d'analyser les interactions homotypiques entre paires de bactéries. L'imagerie AFM et la microscopie électronique à transmission (MET) (figure 2.22) ont été utilisées pour mettre en évidence les pili à la surface de différentes souches de bactéries sauvages ou modifiées au niveau des gènes codant pour la synthèse des pili et des protéines MUB. L'AFM a également permis de réaliser des mesures de spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique afin de quantifier les interactions cellule-cellule. A partir des courbes de forces obtenues, les fréquences relatives des forces et du travail d'adhésion et les distances de ruptures ont pu être évaluées. Les courbes de forces montrant des signatures multiples ont été traitées par le modèle WLC (2.9), ce qui a permis de caractériser les propriétés mécaniques des pili par des paramètres tels que les longueurs de persistance ( $L_p$ ) et de contours ( $L_c$ ).

**Résultats.** La *Single-Cell Force Spectroscopy* (SCFS) a permis de quantifier le comportement d'adhésion entre paires de bactéries provenant de souches aux caractères phénotypiques différents. Les mutants issus de la souche de laboratoire IL1403 exprimant des pili, ont montré une force d'adhésion importante. La détermination du travail d'adhésion représentant l'énergie nécessaire pour séparer deux bactéries initialement en contact, a également montré des valeurs plus élevées pour les souches piliées. Les expériences menées avec des bactéries provenant de différentes cultures ont démontré que les interactions entre les paires de cellules médiées par les pili étaient homotypiques et spécifiques. Ces expériences ont été reproduites et validées avec une souche environnementale TIL448 produisant naturellement des pili ainsi

que des protéines à domaines MUB. En analysant les signatures des différentes courbes de force, nous avons montré que des profils en dents de scie sont obtenus lorsque les pili interagissent avec les protéines MUB et ne résultent pas de la présence d'adhésines le long des pili comme cela a pu être observé chez *Lactobacillus rhamnosus* GG [60].

En effet, les mesures faites d'abord sur des souches de laboratoires (issues de la souche IL1403) qui produisent (pili+), surproduisent (pili++) ou dépourvus de pili (pili-) ont montré des forces et de travail d'adhésion importants (150 à 452 pN et plus de  $50.10^{-18}$  J) chez les souches exprimant des pili à leur surface. En revanche, les forces d'interaction étaient inférieures à 100 pN pour un travail de moins de  $7.10^{-18}$  J chez la souche pili-. Les longueurs de ruptures observées pour la souche pili+ et pili++ ont montrées des distances importantes allant jusqu'à 1500 nm avec des courbes de forces montrant des signatures multiples absentes pour la souche pili-. Ces expériences ont été menées sur une souche d'origine végétale (TIL448) exprimant à la fois les pili et les protéines MUB.

Afin de caractériser les propriétés nanomécaniques des pili, les courbes de forces ont été analysées par le modèle WLC. Les valeurs des longueurs de persistance  $L_p$  et de contours  $L_c$  ainsi déterminées sont variables selon les bactéries mais restent faibles indiquant que les pili sont des macromolécules flexibles mais peu élastiques. Ce résultat corrobore les observations des pili de *L. lactis* faites à la fois par microscopie électronique à transmission et par l'AFM, qui montrent des structures filamenteuses et flexibles dont le nombre et la longueur moyenne varient selon la souche. Chez les souches de *L. lactis*, la capacité d'adhésion des cellules les unes aux autres est donc corrélée à la présence de pili à leurs surfaces. Cette capacité à interagir fortement entre elles par l'intermédiaire des pili est déterminante dans l'établissement de biofilms positifs. L'aptitude à générer ce type de biofilm pourrait être d'un grand intérêt en milieu industriel afin de contrôler des espèces indésirables prolifératives dans la flore laitière ainsi que dans des applications médicales (par exemple vecteurs de molécules spécifiques destinés aux muqueuses intestinales). Cependant, la mise en place de biofilms positifs, nécessitera d'approfondir la compréhension des mécanismes d'interactions pili-pili et pili-autres protéines (par exemple les protéines du lait) et d'analyser leur rôle dans l'étape d'adhésion initiale des cellules et dans la formation, la structuration et la persistance d'un biofilm.

Si l'importance des pili dans l'adhésion cellulaire initiale et dans les interactions entre bactéries chez *L. lactis*, a été clairement démontrée, leur rôle dans la structuration, la cohésion et les propriétés nanomécaniques d'un biofilm doit être approfondi. Ainsi, les travaux qui seront décrits dans les paragraphes suivants s'attachent d'une part à caractériser les interactions à l'échelle moléculaire entre des bactéries et un biofilm et, d'autre part, analysent les possibles corrélations entre la présence de pili et de protéines de surface, le développement et la persistance du biofilm en conditions d'écoulement, représentatives de conditions proches du réel.

Ce travail a été valorisé par l'article [A16](#) [59].

#### 2.5.4 Identification de l'implication des pili dans la formation/structuration d'un biofilm de *L.lactis*

**Contexte.** Tel que décrit plus haut, nous avons pu voir que les pili jouaient un rôle dans l'architecture du biofilm [55] et qu'ils interagissaient entre eux via des interactions homotypiques [59]. Ici, ce travail approfondit ces observations pour caractériser les effets collectifs de ces interactions et mesurer une éventuelle cohésion de l'ensemble. Dans cette étude, le biofilm est mené à une maturité plus avancée (24h-pour être testé sous microscopie à force atomique (AFM) et caractérisé par microscopie confocale.

**Démarches et outils.** Trois types de souches de *Lactococcus lactis* ont ici été testées ; une souche contrôle ne produisant aucun pili à sa surface, une souche produisant des pili mais aucune protéine MUB et une souche produisant à la fois des protéines MUB et des pili. Une

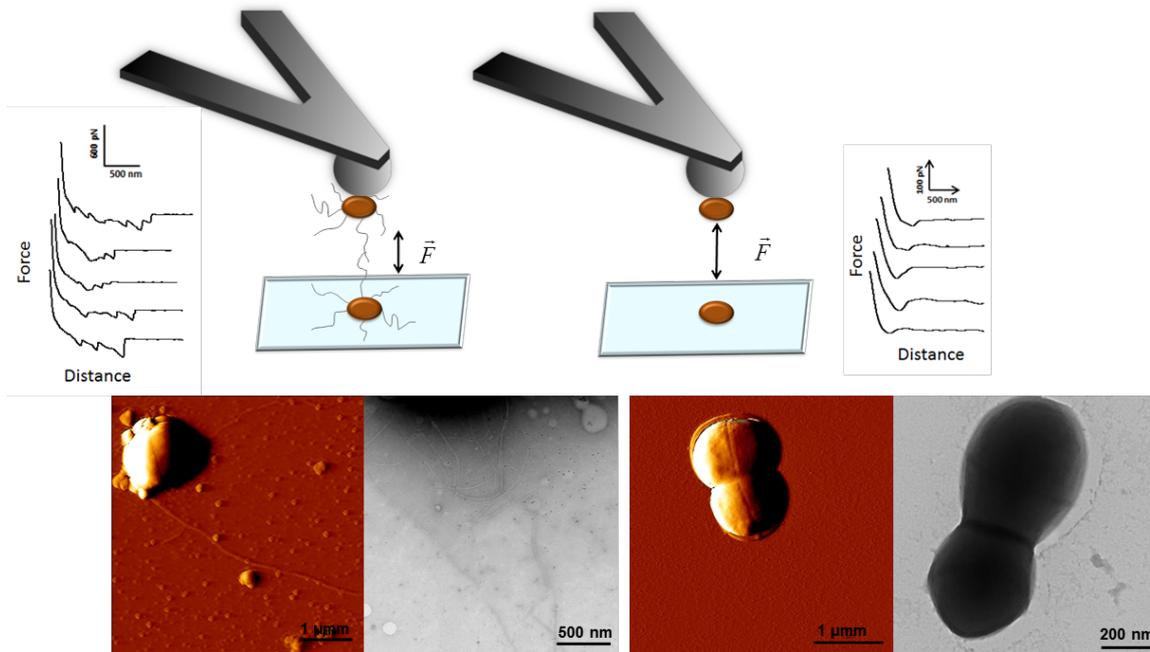


FIGURE 2.22 – Mesure de force de détachement de cellules piliées (gauche) ou non (droite) au moyen de l’AFM. Ligne du bas : lactocoque produisant des pili (long filament) en AFM (1<sup>re</sup> colonne) et en TEM (2<sup>e</sup>) et n’en produisant pas (3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> figure)

pointe d’AFM est mise en contact (Figure 2.23) avec le biofilm permettant de mesurer les paramètres nanomécaniques de celui-ci. Pour gagner en spécificité, des bactéries sont ensuite greffées à cette pointe afin de déterminer la relation entre les interactions et la cohésion du biofilm.

**Résultats.** Les résultats obtenus ont montré que si les pili sont bien impliqués dans l’architecture, la biomécanique et la cohésion des cellules en biofilm de *L. lactis*, d’autres protéines de surface semblent également contribuer à la structuration. Cependant, ces protéines n’ont aucun rôle ni dans les propriétés nanomécaniques ni dans l’adhésion homotypique des cellules en biofilm. La détermination des modules d’Young des différents biofilms a montré que ceux formés par les souches piliées sont mille fois plus élastiques que pour les souches témoins (dépourvues de pili), ce qui démontre le rôle déterminant des pili dans la texture du biofilm. Dans le cas de la souche produisant à la fois les pili et des protéines à domaine MUB le biofilm obtenu est de structure homogène avec une surface lisse, à la différence de la souche produisant uniquement les pili où le biofilm apparaît hétérogène et rugueux. En figure 2.23, les souches qui ne produisent pas de pili forment des biofilms plus rigides (module d’Young 4-100 kPa) avec une topographie de surface plus lisse que les biofilms formés par les souches piliées (module d’Young 0.04-0.1 kPa). La présence de protéines MUB à la surface des lactocoques confèrent au biofilm une structure plus compacte avec une surface plus lisse, tandis que l’élasticité reste inchangée. Cette comparaison entre souches dépourvues de pili, portant de pili et/ou des protéines MUB, a permis de mettre en lumière que si les pili interviennent dans la structuration du biofilm, d’autres protéines de surface jouent également un rôle important dans l’aspect des biofilms formés. En revanche, seule la présence des pili semble avoir un effet sur l’élasticité du biofilm. Par ailleurs, les forces d’interactions homotypiques mesurées entre des cellules immobilisées sur une microbille fixée sur le microlevier et l’interface du biofilm, sont plus élevées chez des souches piliées que chez les souches contrôle ; les pili pourraient ainsi favoriser la cohésion du biofilm.

Ce résultat permet donc d’avancer l’hypothèse que les pili pourraient jouer un rôle dans la persistance d’un biofilm soumis à un écoulement. Ce dernier volet est abordé dans la prochaine

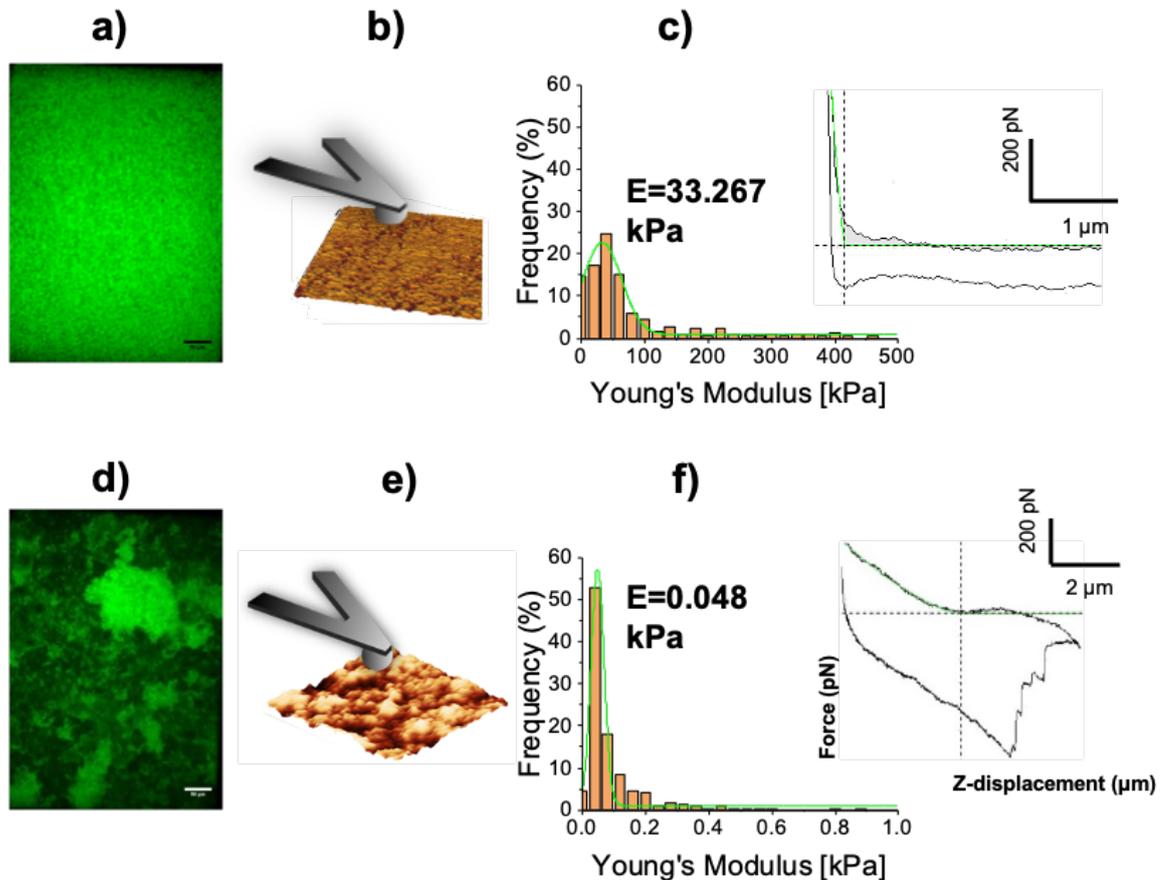


FIGURE 2.23 – Biofilm de lactocoques produisant des pili (Pil+ : a-c) ou non (Pil- : d-f). Imagerie confocale des biofilms en 1ère colonne (a et d), tests d'élasticité et de topographie par AFM (b et e) et correspondance en module d'Young avec spectres de force représentatifs en inserts (c et f)

sous-section.

Ce travail a été valorisé par l'article A18 [61] et les communications C21 et P19.

### 2.5.5 Implication des pili dans la résistance d'un biofilm sous écoulement

L'étude de l'organisation structurale de la composition et des spécificités rhéologiques des biofilms [62], permet de mieux comprendre comment les contraintes de cisaillement générées dans un fluide en écoulement vont agir sur leur développement et leurs propriétés. Les caractéristiques des biofilms soumis à des contraintes hydrodynamiques, notamment chez des bactéries pathogènes fréquentes dans les milieux hospitaliers, en particulier l'adhésion initiale, l'architecture, la cohésion des cellules et les propriétés nanomécaniques, ont été largement documentées ces dernières années. Les objectifs sont multiples ; il s'agit de mieux comprendre les mécanismes de dégradation ou de détachement ainsi que les phénomènes de transfert de masse couplés aux processus mécaniques afin de maîtriser le développement des biofilms [63, 64]. Par ailleurs, en plus des effets liés aux conditions hydrodynamiques, l'influence de certains facteurs biologiques, comme par exemple la production de protéines de surface telles que les pili [65] ou la production de la matrice d'EPS [66, 67], est de plus en plus considérée. Ainsi, les travaux de Wang *et al.* (2018) ont montré que dans un biofilm précoce (8h) d'*E. coli*, les fimbria de type I favorisaient clairement l'adhésion irréversible de microcolonies résistant fortement au détachement en réponse à l'écoulement [65]. Dans le cas de *L.lactis*, le rôle des pili dans la mise en place et le développement d'un biofilm sous un écoulement reste à déterminer

ainsi que l'existence éventuelle d'une réponse au stress mécanique de cisaillement exercé par le flux. En conséquence, après avoir étudié le rôle médiateur des pili de *L.lactis* dans les interactions entre bactéries, leur influence sur l'architecture et l'élasticité du biofilm, nous nous intéressons au comportement dynamique du biofilm, en particulier son détachement ou sa reconstitution, dans des conditions d'écoulement maîtrisées en chambre à écoulement cisailé. L'existence de corrélations entre la présence des pili et la persistance d'un biofilm déjà formé face à des variations de contrainte de cisaillement sera recherchée. Le rôle de l'apport nutritif sur la croissance et la compacité du biofilm sera pris en compte dans l'analyse.

**Démarche et outils.** L'ultime étape dans la démarche du projet Pil2Film est de suivre la croissance d'un biofilm naissant en conditions dynamiques et de déterminer ainsi le rôle du pilus dans sa structure et sa cinétique de croissance-érosion en fonction des conditions hydrodynamiques de l'écoulement. Nous avons démontré précédemment que la présence de pili conditionnait la structure du biofilm et sa cohésion. Les souches de *L.lactis* et ses mutants (figure 2.19) sont inoculés en condition statique jusqu'à 24h puis soumis à un écoulement cisailé dans une chambre microfluidique, avec un apport continu de milieu nutritif à température régulée, en culture pure. Les biofilms sont visualisés par fluorescence confocale à différentes étapes de l'expérience.

**Résultats.** Au cours de ces travaux, nous avons observé les effets de l'écoulement pour des débits croissants (0.1 à 5 mL/min) sur la morphologie et la croissance du biofilm de *L.lactis*. Après une phase d'installation en condition statique, l'écoulement à un débit d'alimentation donné provoque une érosion importante de la surface du biofilm conduisant à une structure hétérogène dès les premières minutes quelle que soit la souche considérée. L'allongement du temps d'écoulement à 24h, permet de voir que le biofilm est capable de persister et de se développer sous contrainte hydrodynamique. Ce développement est plus important lorsque le débit d'écoulement augmente à 5 mL/min conduisant à des biofilms plus structurés, compacts et cohésifs. Ces structures observées après 24h d'écoulement, sont comparables à celles obtenues avant l'écoulement (en condition statique). Cela suggère que l'augmentation des contraintes de cisaillement induites par le flux, entraînerait une réponse au stress mécanique chez les bactéries se traduisant par une croissance et une restructuration du biofilm. Cette hypothèse est explorée en contrôlant l'apport nutritif. Les résultats de ces premières expériences (figure 2.24) montrent que les biofilms ne sont pas en limitations nutritionnelles et leur croissance pourrait être liée à l'augmentation de la contrainte mécanique. Cependant, en comparant les biofilms alimentés par un milieu dilué avec ceux alimentés par un milieu riche à même contrainte (1 Pa), la croissance est plus importante en milieu appauvri et les biofilms sont plus compacts et plus épais. On peut supposer que lors de la mise en place du biofilm, l'appauvrissement du milieu de culture, pourrait générer un stress nutritionnel qui permettrait de favoriser les bactéries sous forme adhérentes plutôt que planctoniques. Ces dernières hypothèses restent à confirmer par la réalisation de nouvelles expériences. Au cours de la mise en place et du développement du biofilm, la production des pili est déterminante. Son rôle dans la persistance du biofilm a été évalué en augmentant le débit par paliers jusqu'à 20 mL/min (figure 2.25). Ces expériences ont permis de voir que les biofilms des souches piliées persistent sous un débit de 20 mL/min malgré une érosion importante, alors que pour les souches « contrôle » seules, quelques bactéries isolées restent adhérentes au support. Ces observations permettent de confirmer que les pili contribuent à la persistance du biofilm soumis à un cisaillement ainsi qu'à son développement et sa restructuration. Ce travail est en cours de valorisation avec un article en préparation.

### 2.5.6 Imaginer des surfaces anti-salissures innovantes

**Contexte.** La première étape de formation du biofilm consiste en l'adsorption de molécules en un film primaire ou film conditionnant. Sa présence ainsi que sa composition générale ont été montrée à plusieurs reprises via des études physico-chimiques de surface, notamment par

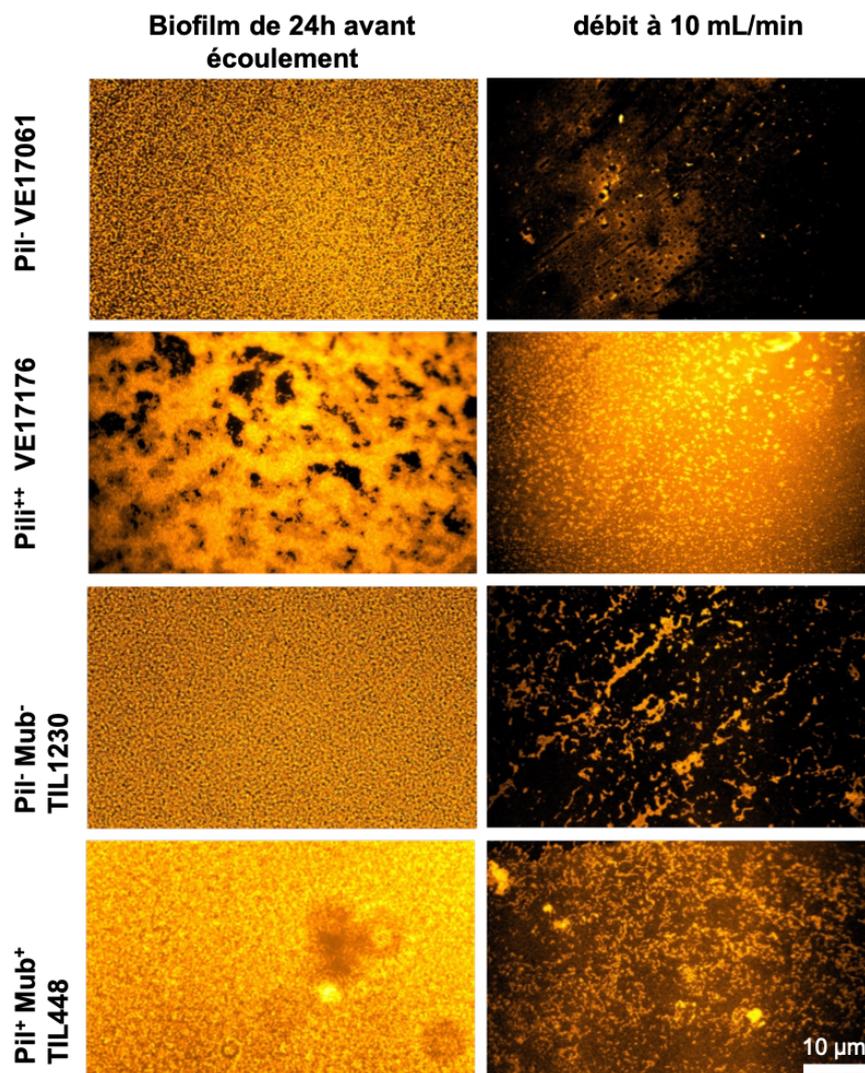


FIGURE 2.24 – Images en microscopie à fluorescence des biofilms obtenus après 24h d'écoulement pour les souches de *L. lactis* et leurs représentations schématiques. A gauche : les biofilms alimentés avec un milieu riche à 2 mL/min (0.4 Pa) après 24h, à droite : les biofilms alimentés avec le milieu dilué et à 5 mL/min. Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués à l'éosine à 2 %.

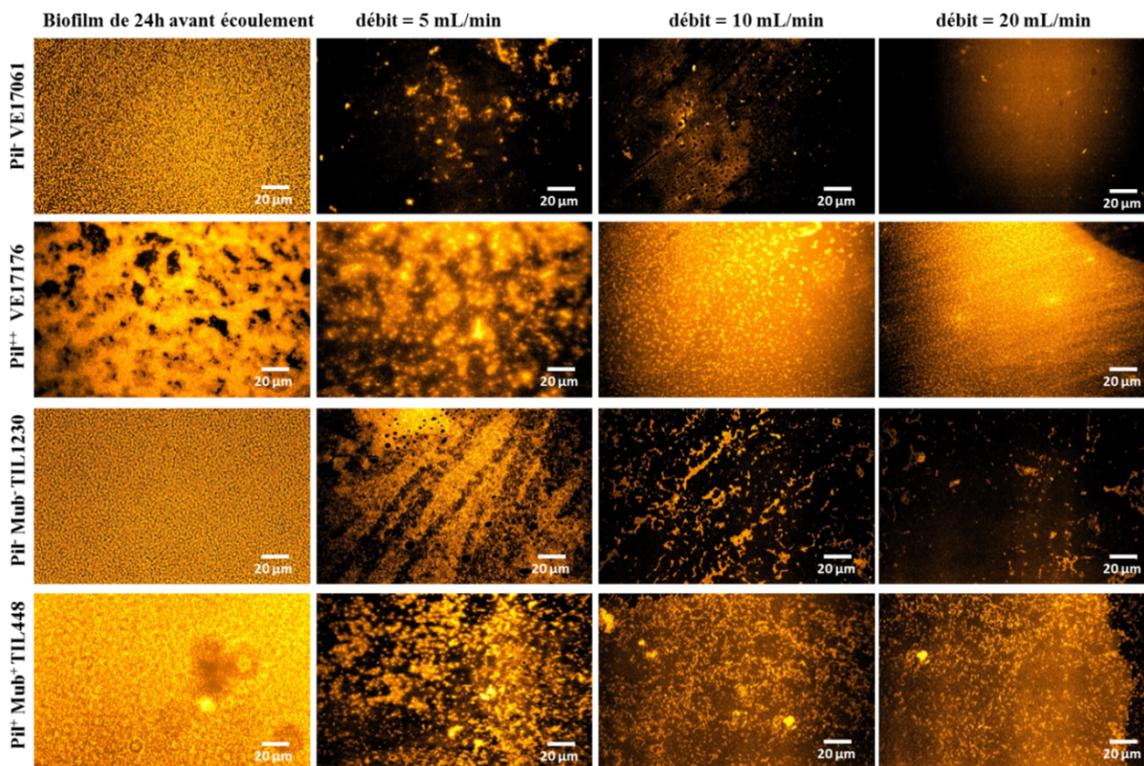


FIGURE 2.25 – Images de microscopie à fluorescence montrant la persistance des biofilms des souches de *L.lactis* avant et après écoulement sous des débits de 5, 10 et 20 mL/min. Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués par l'éosine à 2 %.

des études de spectres infrarouge. Il est composé de protéines ou de fragments protéiques ainsi que de sucres, lipides, substances humiques [68, 69], et également de matière minérale comme des sels [68]. Concernant les molécules organiques, il pourrait s'agir de fragments ou de molécules entières, mais aucune n'a encore été entièrement identifiée. Leur composition dépendrait à la fois de la surface et du milieu environnant (salinité, pH, température). Le rôle du film primaire n'est pas clairement élucidé, il modifie les propriétés physicochimiques de surface et peut donc influencer l'adhésion bactérienne. L'adsorption de certaines protéines comme l'albumine de sérum bovin (BSA) influence l'adhésion de microorganismes marins [70, 71]. Dans le cas de l'eau de mer, les molécules organiques sont omniprésentes, et leur adsorption aux interfaces est un phénomène connu et quasi instantané [68]. De nombreuses études traitent de l'éradication de biofilms par des traitements enzymatiques qui ciblent les microorganismes (lyse cellulaire), les matrices extracellulaires servant d'ancrage faisant alors office de dispersant [72], les signaux inter-cellules (*quorum sensing*) et la dégradation des constituants nutritifs ou élémentaires pour la production de polymères extra-cellulaires. Alors que ce type d'étude s'est majoritairement concentré sur le milieu marin, peu de données fondamentales n'est encore accessible sur les mécanismes de formation d'un film primaire et les stratégies pour l'abolir. L'originalité de ce projet réside sur la compréhension des mécanismes de formation du film primaire et son impact sur l'adhésion biologique et la proposition de stratégies de modifications de surfaces en collaboration avec des partenaires de la Science des Matériaux (Claide Tendero, CIRIMAT et Martina Baum TU Kiel) et d'une stratégie de bioactivation des surfaces par des enzymes immobilisées (Didier Combes, TBI).

Cette étude entre dans le cadre de la thèse de Zibin Nan soutenue en 2021 [73].

**Démarche et outils.** Pour comprendre les mécanismes d'adhésion microbienne sur des surfaces "anti-salissures", différents types de surfaces sont proposés pour évaluer leurs propriétés adhésives dans une chambre à écoulement cisailé :

1. Revêtements en couche mince de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ), d'oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) et de parylène C sur de la silice fondue ( $\text{f-SiO}_2$ ) en utilisant la méthode de dépôt chimique en phase vapeur (CVD),
2. Fonctionnalisation bioactive consistant à immobiliser une enzyme, la subtilisine, sur un substrat de silice fondue en utilisant un procédé de réticulation,
3. Matériaux composites constitués d'une matrice de polythiouréthane (PTU) contenant soit des particules sphériques d'oxyde de zinc (s-ZnO), soit des particules tétrapodales d'oxyde de zinc (t-ZnO) à diverses concentrations massiques.

### Revêtement en couche mince $\text{TiO}_2$ , $\text{Al}_2\text{O}_3$ et parylène C

Notre intérêt se concentre sur leurs caractéristiques physico-chimiques de surface qui influencent le développement du film conditionnant et l'adhésion microbienne qui en résulte (modélisée par deux types de microbilles de polystyrène fonctionnalisées), tandis que la silice fondue nue est utilisée comme contrôle.

Cette section vise à évaluer le lien entre les propriétés physico-chimiques de surface et l'adsorption au sens large du terme des protéines dans le but de pouvoir *in fine* guider le choix du revêtement à élaborer pour atteindre les propriétés visées en termes d'adhésion microbienne. Si beaucoup d'études existent déjà sur cette thématique, émergeant de l'ingénierie du vivant et/ou de la science des matériaux, la majorité se focalise sur un paramètre à la fois (rugosité, charge de surface, composition chimique, mouillabilité). Peu abordent le problème dans sa globalité. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette première partie du travail de thèse qui mobilise l'analyse en composante principale pour établir de manière globale les corrélations entre les caractéristiques physico-chimiques de différentes surfaces et le développement d'un film modèle conditionnant ainsi que son impact sur l'adhésion de microbilles. Quatre surfaces drastiquement différentes ont été sélectionnées : il s'agit de substrats de silice fondue brut et revêtus d'une couche mince de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou parylène C par la technique de dépôt chimique en phase vapeur (CVD). L'objectif de ce travail se base donc sur l'utilisation de matériaux modèles afin de simplifier les interactions et de tirer les premières conclusions. De ce fait, le film conditionnant est une protéine modèle, l'albumine de sérum bovin (BSA), très documentée dans la littérature. Les micro-organismes sont quant à eux modélisés par des billes de polystyrène fonctionnalisées : cette approche est volontairement simplificatrice pour décorréliser les interactions physico-chimiques des interactions biochimiques. Enfin le choix du milieu d'immersion s'est porté sur de l'eau commerciale d'Evian<sup>TM</sup> qui reproduit la force ionique et la composition minérale d'une eau de rivière. En effet, ces travaux de thèse émergent d'un projet antérieur avec l'ANDRA qui consistait à protéger contre le biofouling des capteurs optiques immergés dans la Saulx, pour la surveillance de la qualité de l'eau [74].

Parmi la rugosité, l'hydrophobicité et le potentiel zêta de la surface, l'hydrophobicité est considérée comme le facteur déterminant de l'adhésion microbienne par l'analyse en composantes principales (ACP, figure 2.26), suivie par la rugosité, alors que le potentiel zêta (mesure globale de la charge de surface) apparaît plus faiblement corrélé. Cependant, la distribution électronique qui résulte de la nature des liaisons des matériaux considérés doit influencer localement la façon dont la protéine s'adsorbe (nature de la liaison créée avec la surface, conformation de la protéine et donc encombrement stérique) et affecter ainsi l'adhésion microbienne qui s'ensuit. Selon la nature de la surface (et donc des liaisons), la présence du film conditionnant a une influence différente : elle augmente drastiquement l'adhésion des microbilles sur silice fondue mais pas sur les revêtements en couches minces. Cette influence de la distribution locale des charges est une possible explication à l'adhésion systématiquement plus forte des billes chargées négativement.

**Résultats.** Les surfaces *contrôle*  $\text{f-SiO}_2$ , et à film mince de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  et Parylène C ont été caractérisées selon leur rugosité par microscopie à force atomique (AFM), leur mouillabilité (angle de contact à l'eau), leur charge (potentiel  $\zeta$ ) et leur propriétés d'adhésion au moyen

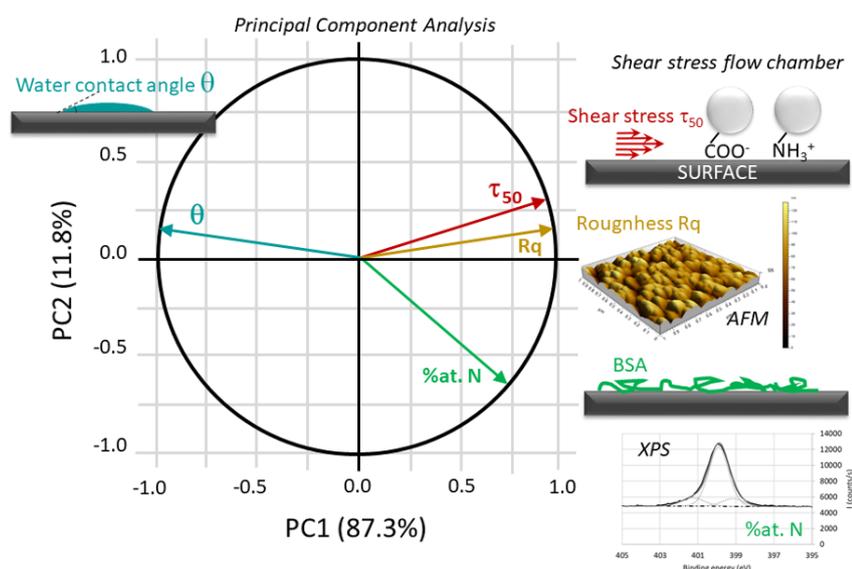


FIGURE 2.26 – Figure regroupant la stratégie du projet. Les surfaces en film mince sont évaluées pour leur caractère anti-adhésif par *Analyse des Composantes Principales* (ACP) selon les indicateurs suivants : Angle de contact  $\theta$ , la contrainte de cisaillement à la paroi  $\tau_p^{50}$  - pour laquelle 50% d'une population se détache à une contrainte à la paroi donnée  $\tau_p$  - la rugosité  $R_q$  et la proportion d'atome d'azote à la surfaces  $\%at.N$  caractérisée par XPS. A noter que le potentiel zéta  $\zeta$  ne figure pas ici.

d'une chambre à écoulement cisailé par mise en contact de microbilles calibrées en taille et fonctionnalisées (positives  $-\text{NH}_2$  et négatives  $-\text{COOH}$ ). L'influence du film conditionnant (BSA) est évalué selon les mêmes critères, et par analyse XPS pour contrôler son adsorption. Les analyses les plus marquantes concernent les surfaces  $\text{TiO}_2$  qui montrent une diminution drastique du caractère hydrophile et du potentiel  $\zeta$  (figure 2.27).

Les propriétés d'adhésion sont ensuite analysées (voir tableau 2.1) en comparant la contrainte de cisaillement à la paroi  $\tau_p^{50}$  nécessaire pour détacher 50% de la population initialement attachée à la surface. La surface contrôle f- $\text{SiO}_2$  présente une très faible capacité d'adhésion lorsqu'elle est nue - essentiellement du à son caractère hydrophile - et devient très adhésive lorsqu'elle est conditionnée par la BSA, quelque soit la charge de la particule. Cette même tendance est démontrée pour les surfaces recouvertes de  $\text{TiO}_2$  avec une meilleure performance pour des particules chargées positivement. Ce résultat a permis de mettre en évidence les effets anti-adhésifs du  $\text{TiO}_2$  par rapport aux deux autres candidats. L'avantage également qu'offre les oxydes de titane sont leurs propriétés photo-catalytiques qui auraient un effet biocide et ajouterait ainsi une nouvelle propriétés dans la lutte contre l'encrassement des surfaces [75].

Ce travail sur les films mince est une partie de la thèse de Zibin Nan [73] et fait l'objet de communications orales (C19, 20, 22, 25, S16, 17) et l'article A19[76].

## Fonctionnalisation bioactive d'enzymes

La majorité des approches de lutte contre les biofilms par des enzymes s'est focalisée sur l'utilisation d'enzymes en suspension qui visait principalement à disperser les biofilms déjà installés. L'objectif de ce travail a été de proposer une approche innovante en décorant une surface - vouée à être exposée aux contaminants - avec des enzymes permettant de dégrader un contaminant modèle. Selon un précédent criblage d'enzyme [72], une endopeptidase à sérine, la subtilisine a démontré son efficacité pour prévenir la formation du biofilm d'un micro-organisme marin en état libre dans le milieu. C'est une enzyme industrielle à faible coût.

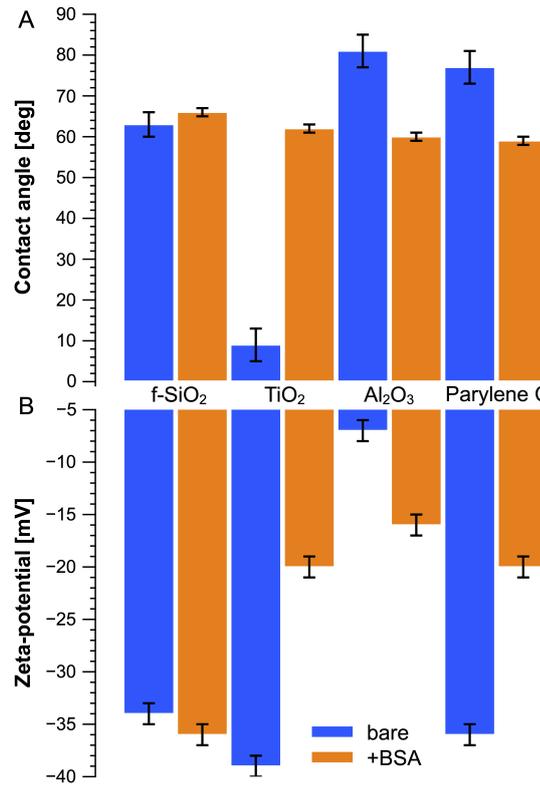


FIGURE 2.27 – **A.** Angles de contact à l'eau (degré) et **B.** potentiel  $\zeta$  (mV) des surfaces de silice fondue f-SiO<sub>2</sub>, et revêtues par TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et Parylène C sans traitement (barres bleues) ou exposées à la BSA (barres oranges). Les barres d'erreur sont les écart-types sur les classes de données ( $n=3-10$  par condition).

$\tau_p^{50}$ (Pa)	NH <sub>2</sub> (+)		COOH(-)	
	bare	+BSA	bare	+BSA
f-SiO <sub>2</sub>	1.1 ± 0.3	23 ± 7	5 ± 3	n/a
TiO <sub>2</sub>	17 ± 4	9 ± 4	n/a	n/a
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2 ± 1	1.1 ± 0.3	24 ± 9	9 ± 3
Parylène C	5 ± 2	3 ± 2	22 ± 6	n/a

TABLE 2.1 – Contraintes de cisaillement à la paroi  $\tau_p^{50}$  pour les 4 types de surfaces analysées conditionnées avec de la BSA (+BSA) ou nues (bare) utilisant des billes chargées positivement (NH<sub>2</sub>) et négativement (COOH). Si la population détachées est inférieure à la moitié, l'indicateur  $\tau_p^{50}$  est marqué *non atteint* (n/a)

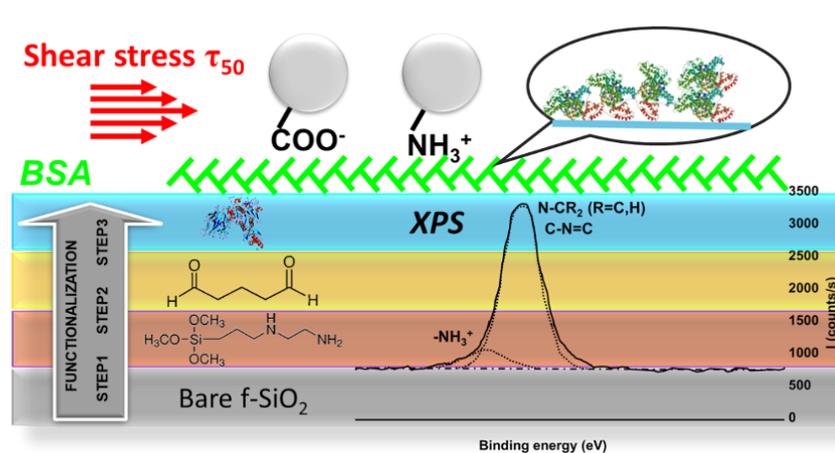


FIGURE 2.28 – Schéma méthodologique décrivant la conception des enzymes immobilisées sur une surface de silice fondue et leur caractérisation par essais d'adhésion/détachement en chambre à écoulement cisailé.

Pour profiter du potentiel anti-fouling de la subtilisine et développer son usage contre le biofilm, la subtilisine a été immobilisée par liaison covalente sur la silice fondue dont la surface a été pré-traitée avec de la N-[3- (triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine et du glutaraldéhyde. Ensuite, les propriétés adhésives de cette fonctionnalisation enzymatique ainsi que la silice fondue ont été évaluées dans la chambre à écoulement cisailé soit directement, soit pré-immersé dans la solution de BSA qui a servi de modèle de conditionnement des protéines. Enfin, des modèles de micro-organismes, y compris des modèles non biotiques (c'est-à-dire les microbilles de polystyrènes fonctionnalisées par des groupes carboxyle ou amine) et biotiques, ont été utilisés et leurs populations résistant à l'écoulement de cisaillement-contrainte ont été mesurées pour étudier la capacité anti-adhésive du revêtement enzymatique (figure 2.28). Pour valider la fonctionnalisation de la subtilisine, une analyse XPS a été conduite.

L'hypothèse principale émise dans ce projet est que le film primaire conditionne l'adhésion initiale de micro-organismes aux surfaces. La formation de ce film et son effet sur l'apparition des biofilms sont déjà largement connus et constituent donc une cible dans l'élaboration des stratégies présentées ici. Une seconde hypothèse permet de considérer que l'immobilisation d'enzymes aux surfaces est aussi voire plus efficace que des enzymes libres.

**Résultats.** Sur la même base que pour les surfaces revêtues par film mince mentionnée précédemment, les expériences ont été également réalisées avec un dispositif de chambre à écoulement cisailé. Les particules modèles utilisées sont les particules de polystyrène avec des groupements carboxyles ou amines afin de suivre l'effet de la charge sur les interactions (à pH neutre). Le tableau 2.2 rapporte la contrainte de cisaillement à la paroi  $\tau_p^{50}$  avec les deux types de billes, sur les surfaces à différentes étapes de traitements et fonctionnalisation. Les résultats montrent que :

1. L'adhésion est bien plus importante lorsque la surface est conditionnée par la BSA,
2. La subtilisine n'influe pas sur les propriétés d'adhésion (contrôle)
3. Le conditionnement de la BSA sur la surface [f-SiO<sub>2</sub>+Subtilisin] n'a pas ou très peu d'influence sur les propriétés d'adhésion.

Ces résultats sont basées sur des modèles simples mais apporte une preuve de concept indiquant que l'immobilisation d'une protéase peu onéreuse telle que la subtilisine ici, sur des surfaces de silice fondue permet d'atténuer voire abolir l'influence du conditionnement modèle (BSA). Ces résultats sont encore en phase de consolidation puisque pour aller plus loin, des micro-organismes représentatifs ont été utilisés et le traitement et l'interprétation des données est en cours. Parmi ces souches, nous avons utilisés *Candida glabrata* et *Staphylococcus aureus*

Particule (fonction)	Surface	$\tau_p^{50}$ (Pa)
-NH <sub>2</sub>	f-SiO <sub>2</sub>	5.1 ± 2.7
	f-SiO <sub>2</sub> +BSA	34.1 ± 15.1
	f-SiO <sub>2</sub> +Subtilisin	11.3 ± 7.7
	f-SiO <sub>2</sub> +Subtilisin+BSA	6.9 ± 6.0
-COOH	f-SiO <sub>2</sub>	1.1 ± 0.3
	f-SiO <sub>2</sub> +BSA	22.8 ± 6.9
	f-SiO <sub>2</sub> +Subtilisin	0.9 ± 0.4
	f-SiO <sub>2</sub> +Subtilisin+BSA	1.5 ± 0.5

TABLE 2.2 – Contraintes de cisaillement à la paroi  $\tau_p^{50}$  pour les différentes étapes fonctionnalisation de surfaces (nue, [+BSA], [+Subtilisin] et [+Subtilisin+BSA] utilisant des billes chargées positivement (-NH<sub>2</sub>) et négativement (-COOH). Si la population détachée est inférieure à la moitié, l'indicateur  $\tau_p^{50}$  est marqué *non atteint* (n/a).

couvrant le domaine biomédical, *Saccharomyces cerevisiae* pour le domaine agro-alimentaire et *Pseudoalteromonas* D41 pour le domaine maritime.

Ce travail est valorisé via des communications (C20, 22, 23, 25, P18, S16-18) et un article soumis (A21).

### Matériaux composites PTU/ZnO

Des matériaux composites innovants, constitués d'une dispersion de particules de ZnO (de morphologie sphérique ou tétrapode) au sein d'une matrice de polythiourethane (PTU), ont été élaborés en vue de diminuer l'adhésion des micro-organismes [77, 78]. L'évolution induite par l'incorporation des deux types de ZnO dans des proportions massiques allant de 1% à 5% (w/v) a été étudiée en comparant, dans un premier temps, les caractéristiques de surface (rugosité, rigidité, angle de contact et potentiel zêta) avec celles des matériaux de référence (PTU et polydiméthylsiloxane PDMS) tel que décrit dans les deux précédentes sections. Par la suite, les performances d'adhésion sur deux micro-organismes pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Candida glabrata* (collaboration avec Université de Lisbonne) ont été évaluées par microscopie à force atomique à l'échelle d'une cellule (collaboration Cécile Formosa (TBI) et Etienne Dague (LAAS-CNRS)) et sous écoulement cisailé. A l'échelle de la population, des mesures de détachement de microbilles de polystyrène fonctionnalisées par des groupes amine (possédant une charge positive) ont également été menées en chambre à écoulement cisailé. Les résultats montrent que l'adhésion de *S. aureus* et *C. glabrata* est plus faible sur PTU et les différentes déclinaisons de PTU/ZnO en comparaison avec les surfaces de PDMS. De plus l'adhésion de *S. aureus* est d'autant plus faible que la quantité de particules de ZnO (sphérique ou tétrapodale) incorporée dans la matrice PTU est élevée (voir figure 2.29). Vis à vis des deux micro-organismes, le matériau composite comportant 5% en masse de tétrapodes ZnO présente les meilleures performances anti-fouling en réduisant de façon significative l'adhésion des cellules. A l'échelle de la population, les résultats obtenus en chambre à écoulement sont cohérents avec les conclusions issues des mesures AFM (données en cours de valorisation).

Ce projet a fait l'objet d'un article publié (A17 [79]) pour les analyses par AFM, et un article en préparation (A22) pour les analyses sous écoulement cisailé.

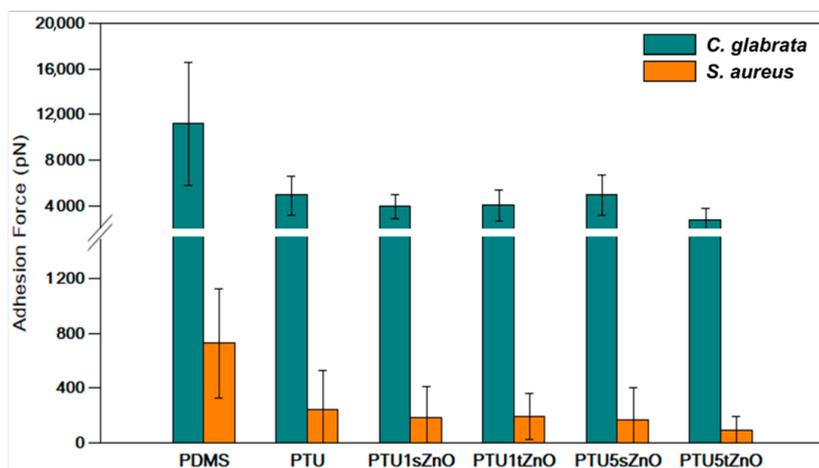


FIGURE 2.29 – Comparaison des forces d’interaction obtenues par AFM contre différentes surfaces enrichies en ZnO pour des espèces *Candida glabrata* et *Saphylococcus aureus*

## Chapitre 3

# Analyse prospective des activités de recherches

The true method of knowledge is  
experiment

---

*William Blake*

### 3.1 Préambule

Le chapitre précédent a présenté une synthèse des travaux et actions réalisés depuis le doctorat essentiellement tournée vers la **compréhension et l'identification des mécanismes biophysiques, physico-chimiques et biologiques impliqués dans la formation et la structuration de biofilm et d'agrégats**.

Cette thématique engendre plusieurs perspectives en continuité qui seront présentées brièvement en section 3.2 au travers de quelques applications spécifiques.

Néanmoins, dans le cadre de ma démarche actuelle de demande d'habilitation à diriger les recherches, j'ai engagé une réflexion sur des perspectives à spectre d'applications plus large, vers des problématiques liées au bioréacteur en appliquant les outils et méthodes développés aux échelles locales.

Il s'agit ici d'apporter une meilleure compréhension sur l'hétérogénéité du bioréacteur en s'appuyant sur les questionnements suivants :

- Que voit la cellule lorsqu'elle est transportée dans un bioréacteur ?
- Quelle est le temps caractéristique d'adaptation d'une cellule lorsqu'elle est soumise à un nouvel environnement local ?
- Comment explorer l'hétérogénéité single-cell expérimentalement ?

Ces aspects seront explorés en deuxième section de ce chapitre (section 3.3 : Lever les limitations aux transferts dans les bioréacteurs par des approches locales).

### 3.2 Adhésion et biofilm

Depuis le début de ma carrière scientifique, j'ai développé un champs d'activité sur les interactions microbiennes au moyen d'outils biophysiques innovants qui ont permis de mettre en lumière des mécanismes d'adhésion d'espèces biologiques sur des surfaces biotiques ou abiotiques aux échelles locales, visant à abolir le développement de contaminants biologiques mais également moduler leur colonisation (projet LACTAD sur la machine à traire par exemple). Cette expertise s'est vue reconnue par l'invitation à des conférences sur le domaine et l'évaluation de projets et articles internationaux. Pour maintenir cette inertie, plusieurs actions sont été initiées au travers de dépôt de projets et thèses. Ci-dessous 2 sous-thématiques appliquées

en cours pour des perspectives à 5 ans : (i) le biocontrôle (biopesticides) et (ii) le procédé de filtration. D'autres projets en cours et en collaboration ne figureront pas dans cette partie car trop anecdotiques pour en dégager des perspectives qui me sont propres.

### 3.2.1 Accumulation de particules biologiques sur un support filtrant : étude dynamique et analyses morphologiques

Cette perspective à moyen terme entre dans le cadre de la thèse de Kevin DEMONT (début Oct 2023) dont le contenu a été brièvement exposé en chapitre 1.

La filtration est un procédé devenu largement répandue en industrie pour séparer des éléments solides dans un milieu liquide. Dans certains domaines d'application, comme dans le traitement des eaux usées, l'agronomie, l'industrie agroalimentaire ou la santé, les éléments filtrés sont des particules biologiques d'intérêt. Un inconvénient néanmoins survenant au cours des procédés de filtration est le phénomène de colmatage qui obstrue les filtres et devient lourd à gérer industriellement. Une précédente thèse menée par Alberto Valencia (soutenue en 2020 [80]) cherchait à caractériser le colmatage survenant lors de la filtration de levures, un micro-organisme simple et largement étudié dans la littérature. Le colmatage a tout d'abord été étudié en modélisant les microorganismes par des billes de polystyrène de tailles approximativement identique et incompressible voir figure 3.1. Lorsque la filtration des levures a été étudiée, il s'est avéré que les propriétés du gâteau de levures différaient de celles du gâteau de polystyrène. Plusieurs hypothèses sont envisageables : les cellules ne sont pas parfaitement sphériques, peuvent se déformer et s'agencer différemment dans le gâteau et peuvent interagir entre cellules et avec le filtre.

L'objectif de cette thèse est de caractériser la physiologie et la morphologie de levures *Saccharomyces cerevisiae* et de 5 de ses mutants (taille, forme, charge de surface, compressibilité) et de comprendre leur impact sur les propriétés du gâteau de filtration (forme, porosité, compressibilité, etc.). Un premier travail consiste à caractériser les propriétés d'interactions de levures avec des surfaces modèles (PS, silice et fonctionnalisées type "paroi de levure) et d'auto-aggrégation afin d'en dégager des éléments de compréhension de mécanismes de formation du gâteau. Tel que présente en figure 3.1, un microscope à épifluorescence de type horizontal a été développé dans l'équipe TIM et permet le suivi en temps réel de la formation du gâteau en 2D. Les puces microfluidiques sont présentées en figure 3.2. Le développement d'un programme en Python® apporte une analyse de transport par suivi de particule, et de profil de l'interface. A terme, nous visons la possibilité de renvoyer des données morphologiques durant la phase de filtration.

En comprenant tous les éléments à l'origine du colmatage, il sera possible de **concevoir un dispositif de filtration tangentielle** qui permette de réaliser une filtration en s'affranchissant du phénomène de colmatage des filtres par effet de cisaillement. Ce projet est associé avec Philippe Schmitz (TBI et directeur de la thèse), Pierre Joseph (LAAS) pour la conception des puces microfluidiques et Hélène MArtin-Yken (TBI) pour la paroi des levures.

### 3.2.2 Développement de biopesticides durables : rôle de l'adhésion microbienne dans l'intestin du ravageur

J'ai initié cette action, nouvelle depuis seulement début 2024, en m'appuyant sur une forte collaboration existante entre TBI et l'Université Saint-Joseph (Beyruth, Liban) à travers des projets tels que EU Integrated Pest Management (IPM-4-Citrus 2017-2023), PHC-Utique (2022- 2024) et EU Prima SAFWA (2023-2027), portés par TBI (Luc Fillaudeau et César Acevès-Lara dans l'équipe TIM). Cette action est initiée ici au travers du projet M2 *CASCADE* de Gaëlle RIZK sur la "Caractérisation de l'adhésion et de la dynamique de colonisation des spores pour l'évaluation de *Bacillus thuringiensis* sous écoulement de cisaillement dans le développement de biopesticides durables".

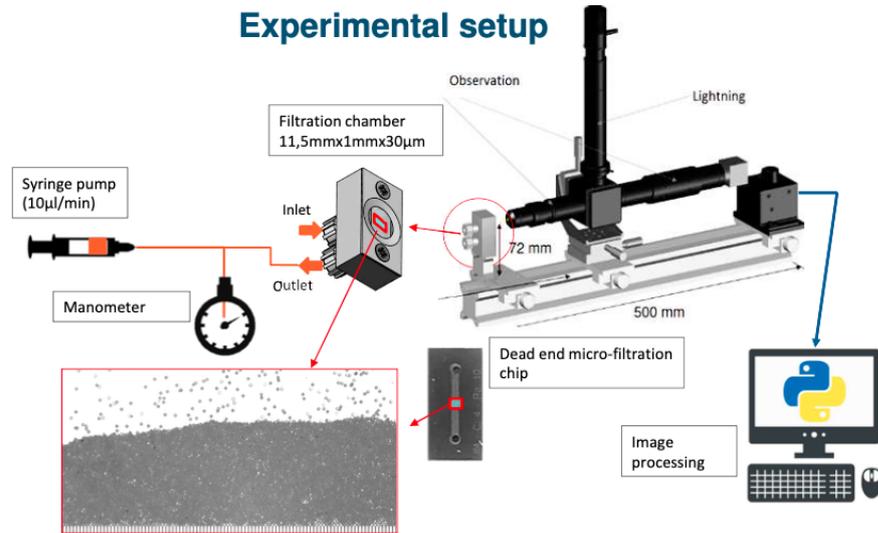


FIGURE 3.1 – Dispositif de visualisation d’une cellule de filtration 2D au moyen d’un microscope horizontal à épifluorescence. La cellule de filtration est un microsystème constitué de fentes micrométrique permettant le suivi de l’accumulation de particule/ microorganismes par vue de côté (approche 2D).

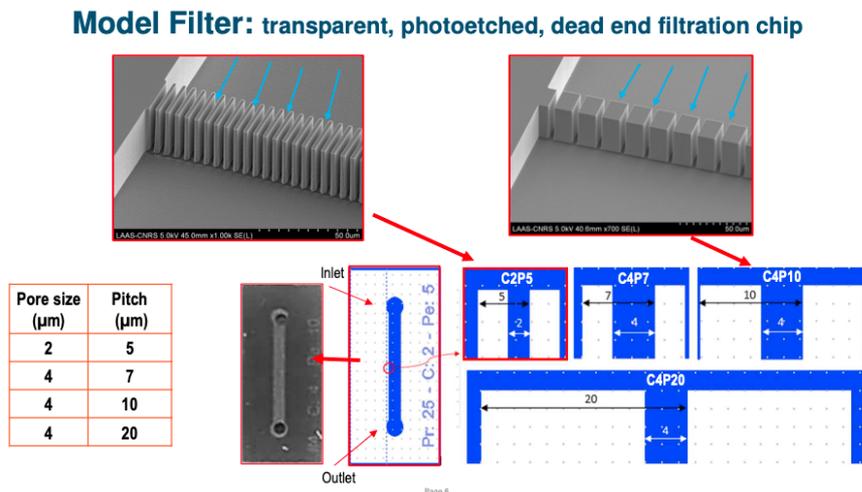


FIGURE 3.2 – Exemples de géométrie des puces microfluidiques de filtration frontale utilisées dans le projet PHYS-CAKE. Photos par imagerie MEB (vignettes du haut) permettant de démontrer d’un important rapport d’aspect [hauteur / largeur] constituant un soit un verrou technologique. Le flux hydrodynamique est symbolisé par les flèches bleues.

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie du sol à Gram positif présente dans de nombreux habitats naturels, tels que les champs de culture, les stocks de nourriture, les insectes morts et plusieurs plantes et environnements aquatiques différents [81]. Le véritable rôle écologique de *B. thuringiensis* est mal compris, étant considéré à la fois comme une bactérie du sol, un membre de la phyllosphère et un entomopathogène. Elle est cependant bien connue pour produire des protéines toxiques aux propriétés insecticides, connues sous le nom d'endotoxines  $\delta$ , pendant sa phase de sporulation. Celles-ci s'accumulent sous forme de cristaux d'inclusion appartenant à deux catégories différentes : *Cyt* et *Cry*, toutes deux perforantes de la membrane mais avec des structures non apparentées [82, 83]. Les endotoxines  $\delta$  se sont révélées très efficaces contre divers organismes, tels que les lépidoptères, les coléoptères, les diptères, les nématodes et même d'autres bactéries, tout en étant considérées comme sûres pour les mammifères [84]. Par conséquent, les biopesticides à base de *B. thuringiensis* (**Bt**) représentent aujourd'hui 97 % du total mondial (Commission européenne, 2022). Ces dernières années, l'utilisation intensive de pesticides chimiques a causé plusieurs problèmes tels que la contamination des sols, de l'eau et des sources de nourriture, entraînant une résistance des parasites [85]. Les biopesticides gagnent régulièrement en popularité, car ils ont non seulement des applications agricoles, forestières et de vecteurs de maladies efficaces, mais sont également considérés comme une alternative écologique et durable aux pesticides chimiques, principalement en raison de leurs effets ciblés et de leur biodégradabilité [86]. L'objectif du projet est de caractériser les propriétés d'interaction des bactéries et des spores contre des surfaces inertes dans des conditions de cisaillement.

**Méthodes.** Les propriétés d'interaction (hydrophobicité et charge électrostatique) de Bt ont été déterminées à l'aide d'un Zétasizer (Malvern) pour une collection de souches (H3, Delfin, Lip, Bti, Ar23). Les dynamiques d'interaction ont été étudiées en utilisant une chambre à écoulement avec des surfaces de polystyrène, avec et sans revêtement de mucine. Les propriétés électrostatiques ont été mesurées par le potentiel zêta.

**Résultats.** Les cinétiques de croissance bactérienne ont montré que la phase stationnaire est atteinte après 12 heures en milieu LB. En milieu T3, une faible diminution de la DO a été observée après 48 heures en raison de la formation de spores et de cristaux. Les mesures de potentiel zêta ont révélé que les cellules végétatives de H3, Delfin et Lip ont un potentiel zêta plus négatif que leurs spores, tandis que pour Bti et AR23, le potentiel zêta des cellules végétatives est similaire à celui de leurs spores/cristaux. Les expériences de chambre à écoulement ont montré une absence d'adhésion des cellules végétatives sur les surfaces revêtues de PGM, avec seulement Lip et Ar23 présentant une faible adhésion sur le polystyrène nu. Pour les spores, un détachement important a été observé pour Bti, AR23 et Lip entre 10 et 40 Pa, se stabilisant à 140 Pa avec environ 90 % de détachement, excepté pour H3 et Delfin avec seulement 60 % et 70 % de détachement respectivement. En présence de mucine PGM, une forte adhésion des spores des cinq souches a été observée.

La compréhension des interactions entre **Bt** et la membrane péritrophique de l'insecte, ainsi que les dynamiques d'adhésion et de détachement sous flux de cisaillement, est essentielle pour optimiser l'utilisation des insecticides à base de **Bt** et leur efficacité dans différentes conditions environnementales. Les résultats obtenus restent encore très préliminaires. Néanmoins, plusieurs perspectives peuvent être envisagées notamment sur les mécanismes d'interaction entre un spore, cristal, ou bacille avec la membrane intestinale (péritrophique) de l'insecte. Un projet de thèse en co-tutelle avec l'USJ est en cours d'écriture à l'horizon 2026.

### 3.3 Lever les limitations aux transferts dans les bioréacteurs par des approches locales

#### 3.3.1 Contexte et état de l'art

Les applications biotechnologiques actuelles nécessitent la production de grandes quantités de produits à faible coût et de haute qualité. Cela ne peut être obtenu que si les processus développés à l'échelle du laboratoire sont fidèlement transposés à l'échelle industrielle. La physiologie cellulaire et, dans de nombreux cas, les rendements et la qualité des produits dépendent fortement des conditions environnementales (mélange, transfert d'oxygène, température, pH, concentration en nutriments, etc.). Les bioréacteurs sont essentiellement des systèmes multiphasiques (gaz, liquide et cellules) où le transfert de masse entre les phases joue un rôle central dans la définition des taux de réaction biologique interne. Ce taux de transfert de masse interfaciale, sert de paramètre d'entrée pour tous les modèles de réaction biologique, y compris les modèles chimiquement structurés et métaboliques [87], et fournit des limites supérieures pour les taux de biotransformation. Les cellules microbiennes transportés dans les bioréacteurs à grande échelle sont **confrontées à des conditions fluctuantes** (pH, température, nutriments, oxygène, etc.) qui peuvent avoir un impact sur le métabolisme et la physiologie des microorganismes et, finalement, sur la productivité globale [88]. Au cours des dix dernières années, de nombreuses tentatives ont été faites pour comprendre le comportement et la réponse de différentes espèces de microorganismes procaryotes et eucaryotes d'importance industrielle aux conditions oscillantes causées par un macro-mélange imparfait à l'échelle du bioréacteur [89]. En raison de la forte hétérogénéité spatiale du processus, l'importance de se concentrer sur la micro-échelle est indiscutable et diverses stratégies ont été adoptées pour réduire l'échelle du bioprocédé aux microbioréacteurs [90]. Au cours des dix dernières années, la microfluidique a révolutionné l'analyse au niveau de la cellule unique grâce au développement de puces à l'échelle du picolitre, ouvrant ainsi de nouveaux horizons [91]. La littérature ne montre pas de liens évidents entre les études expérimentales de type « cellule unique » et les modèles prédictifs de bioréacteurs, entravant ainsi l'optimisation des bioprocédés. De nos jours, ces modèles facilitent la conception des bioréacteurs en termes de temps et de coût énergétique et pourraient fournir des avancées substantielles pour la formulation de bioproduits en faveur d'une bioéconomie durable [92].

#### Comprendre l'hétérogénéité des bioréacteurs en réduisant l'échelle des processus

La présence de gradients spatiaux dans les paramètres de culture, tels que les gaz dissous, le pH, la concentration des substrats et le taux de cisaillement, entre autres, est un problème important qui se produit fréquemment dans les bioréacteurs à grande échelle [88, 93-95]. Ce problème est causé par un mélange inefficace résultant des limitations inhérentes aux méthodes traditionnelles de changement d'échelle et des contraintes pratiques lors de la conception et de l'exploitation des bioréacteurs à grande échelle. Lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement hétérogène, les cellules sont continuellement exposées à des conditions fluctuantes au fur et à mesure qu'elles traversent les différentes zones d'un bioréacteur [88, 94, 96]. De telles fluctuations peuvent affecter le métabolisme cellulaire, les rendements et la qualité des produits d'intérêt. Certains efforts sont constamment déployés pour simuler les bioréacteurs en tenant compte de l'hétérogénéité des substrats, des conditions physiques et de la culture (modèles métaboliques et dynamiques) [97-100]. Plusieurs tentatives ont été faites, tant expérimentalement [91, 101, 102] que numériquement [94], avec une approche de réduction d'échelle pour contrôler autant que possible tous les paramètres cruciaux de la culture. À ce jour, aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur l'analyse expérimentale du transfert de masse à l'échelle d'une seule cellule couplé à des modèles cinétiques.

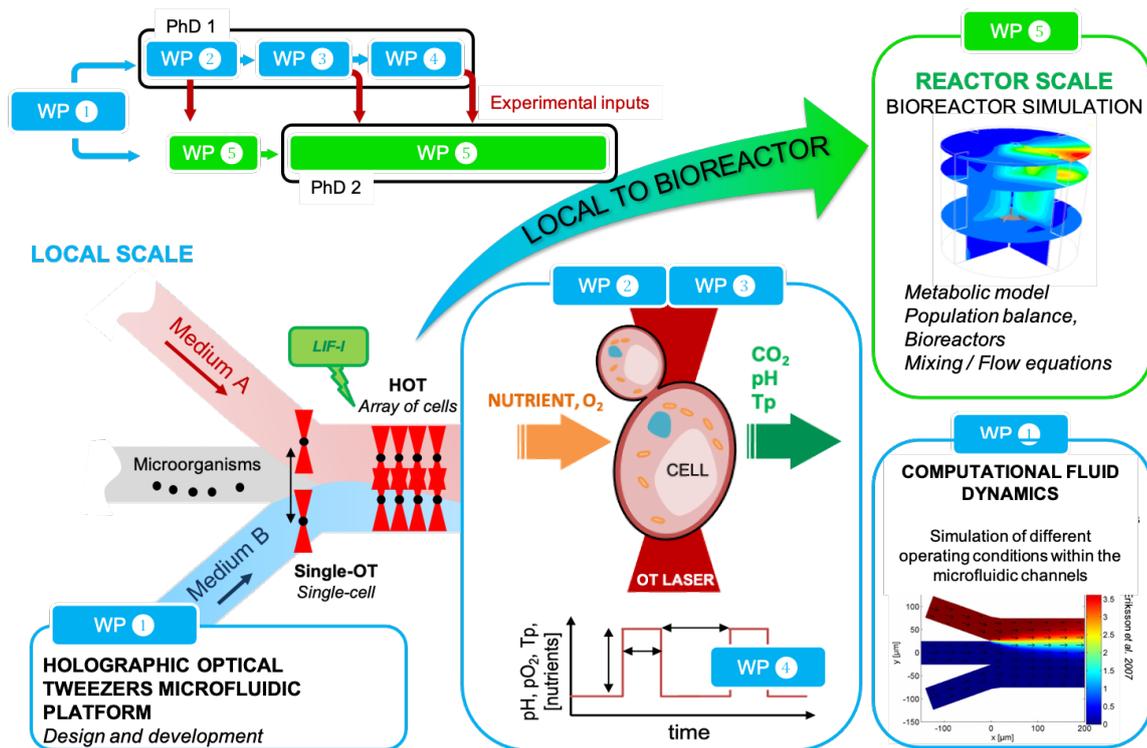


FIGURE 3.3 – Exemple de diagramme permettant de dégager les approches multi-échelles pour appréhender l’hétérogénéité du bioréacteur. Plusieurs workpackage (WP1-WP5) impliquant plusieurs compétences de l’équipe TIM et deux thèses. Ce projet vise à créer une plateforme d’analyse de l’hétérogénéité en couplant les échelles et les approches numériques et expérimentales.

### Modèle de bilan de population pour décrire le bioréacteur.

Se référer au concept de bilan de population pour décrire l'évolution d'une population de microorganismes vivants peut sembler évident. De nombreux modèles de bilan de population se réfèrent à une variable unique (conduisant à un modèle structuré par âge, taille, masse ou taux de croissance), mais cela est clairement insuffisant lorsque l'on vise à coupler le comportement cellulaire à la composition du milieu externe [103, 104]. Malheureusement, la liste des variables intracellulaires à considérer est énorme et la plupart des lois élémentaires décrivant les interactions entre ces variables internes ne sont pas connues. Cela a pour conséquence d'ajouter plus de dimensions à la description de la population, ce qui entraîne des problèmes importants de modélisation et de calcul. Un certain degré de réduction de la complexité du modèle doit être introduit, mais l'interdépendance des phénomènes physiques et biologiques rend cette tâche extrêmement difficile [105-108]. De plus, étant donné que l'hétérogénéité spatiale est également considérée, la structure du modèle pour la dynamique de la phase biologique doit être compatible avec les équations de transport. Des approches lagrangiennes [109] et eulériennes [104, 110, 111] ont été développées par le passé, mais le couplage bidirectionnel a été rarement envisagé [112, 113]. En plus du mouvement de flux et du grand nombre de propriétés cellulaires, le calcul des taux de production/consommation intégrale dus à la population microbienne représente un énorme défi. Le groupe de recherche TIM à TBI est parmi les rares à avoir publié des simulations entièrement couplées bidirectionnellement de *E. coli* et *S. cerevisiae*, mettant en lumière les problèmes de mélange dans les bioréacteurs à différentes échelles. Le transfert de masse entre le liquide et la cellule (absorption), l'élongation cellulaire (augmentation de la biomasse), la division (augmentation du nombre), le métabolisme et les fluctuations externes sont également importants et opèrent sur des échelles de temps se chevauchant, conduisant à des problèmes de fermeture non conventionnels [114-116]. Certains développements ont été inclus dans l'outil de simulation de bioréacteur interne ADENON, qui combine une approche par compartiments, un modèle de bilan de population et un modèle métabolique [113]. Pendant les quatre années d'un projet IDEX financé par l'ANR (chaire d'attractivité de R.O. FOX, Iowa State Univ., 2016-2019, Projet BIREM), un modèle de bilan de population (PBM) bivarié en 2-D a été développé en utilisant la taille des cellules et le taux de croissance potentiel comme variables internes. Une validation croisée intensive des codes numériques a été réalisée à travers une comparaison des techniques de Monte-Carlo, Méthode des Volume Finis. Enfin, une extension en 5-D incluant la capacité d'absorption due à plusieurs systèmes (perméases et phosphotransférase) a été développée [115, 117].

Tous ces développements numériques démontrent qu'il est nécessaire de caractériser le comportement des cellules dans leur environnement local en combinant les données expérimentales à l'échelle de la cellule unique pour modéliser les bioprocédés de microorganismes pertinents en raison de leur fort impact industriel.

### Réponses physiologiques des cellules aux fluctuations environnementales

Des changements de la macro-morphologie dus au stress, y compris la privation, ont été observés précédemment chez *Escherichia coli* [118], mais aussi chez plusieurs autres microorganismes exposés à des conditions de culture oscillantes. Par exemple, *Corynebacterium glutamicum* tend à former des agglomérats en conditions de stress [119], et les cellules de *S. cerevisiae* deviennent quant à elles plus grandes en raison d'une perturbation du bourgeonnement [120, 121]. On suppose qu'un environnement oscillant affecte la durée du cycle cellulaire et, par conséquent, la distribution de la taille des cellules. Guillou *et al.* [121] ont exploré le rôle du glycogène et du tréhalose dans la capacité de *S. cerevisiae* à répondre à une augmentation soudaine du flux de carbone. Ainsi, des cultures continues limitées en glucose en conditions aérobies ont été soumises à une augmentation soudaine du taux de dilution de 0,05 à 0,15  $h^{-1}$ . Dans cette condition, une mobilisation rapide du glycogène et du tréhalose a été observée, coïncidant avec une explosion transitoire du bourgeonnement et une diminution de

la biomasse cellulaire. En général, les liens entre la réponse au stress, le métabolisme central et la division cellulaire sont observés expérimentalement, mais les relations causales entre ces facteurs manquent, de même que la modélisation mathématique.

L'approche proposée ici vise à traiter de telles questions en surveillant en temps réel la division cellulaire, le nombre maximum de divisions par cellule, et le comportement d'une lignée en piégeant les cellules filles l'une derrière l'autre, ainsi que le temps de réponse via des signaux de fluorescence (marquant le dioxygène dissous, la température et le pH en utilisant la technologie LIF-I), et si possible, leur concentration sous des conditions environnementales stationnaires ou oscillantes. L'approche LIF-I sera vue en section suivante.

### Immobilisation des cellules individuelles et exposition à l'environnement local

Plusieurs études ont traité le niveau cellulaire individuel pour comprendre par exemple le vieillissement cellulaire [122] ou les effets de la pression osmotique sur les cellules [123]. Pour exposer les cellules individuelles à un environnement donné, les techniques microfluidiques sont bien adaptées car elles permettent un contrôle fiable de l'environnement local de la cellule. Cette miniaturisation est particulièrement significative lorsque des changements environnementaux rapides sont nécessaires. À cette fin, un certain nombre de ces systèmes, appelés dispositifs *lab-on-a-chip*, ont été développés [pour plus de détails, voir cette revue [124]]. Avec la microfluidique, le flux hydrodynamique devient extrêmement laminaire même avec des forces de cisaillement élevées. Le flux est donc non turbulent et le mélange entre deux fluides adjacents dépendra principalement de la diffusion. Cela ouvre la possibilité de créer des dispositifs où différents milieux peuvent s'écouler en flux adjacents pour des couches limites au mélange très faible [125]. En manipulant une cellule dans un tel dispositif microfluidique, il est possible de changer complètement l'environnement autour de la cellule, avec une très bonne répétabilité. Diverses techniques ont été rapportées pour y parvenir. Une stratégie consiste à diriger la cellule hydrodynamiquement dans une structure de rétention puis modifier en seulement 100 ms l'environnement local de la cellule [126]. Une autre approche consiste à piéger physiquement la cellule, soit par adhésion [127], soit en créant des obstacles dans le flux pour suivre la division cellulaire [128]. Dans le projet de recherche présenté ici, tout contact avec des surfaces qui pourraient introduire un biais dans la réponse cellulaire via la mécano-perception [129] est évité. Ainsi, les pinces optiques semblent être l'outil approprié pour manipuler les cellules individuelles de manière non invasive. En effet, tel que présenté précédemment en préambule de la section 2, les pinces optiques sont un dispositif de microscopie qui focalise un faisceau laser dans un échantillon à travers son objectif. Ce laser induit une force optique pour piéger des objets semi-transparentes (réfractant la lumière) de taille microscopique tels que des particules de latex ou des cellules vivantes. De même, elles peuvent être utilisées pour les manipuler et les transporter dans un nouvel environnement au sein d'un dispositif microfluidique en forme de  $Y$  [123], comme cela est déjà fait avec le dispositif actuel. Cependant, une limitation majeure de l'utilisation des pinces optiques en biologie cellulaire est la fiabilité statistique des données qui peuvent être accumulées dans un délai raisonnable. Cela peut être partiellement résolu en multipliant les pièges optiques. En effet, en utilisant des modulateurs de lumière spatiale, il est possible de produire une multitude de pièges optiques indépendants pour former des réseaux de cellules [130], appelés pinces optiques holographiques (HOT). Il est alors possible de piéger plusieurs dizaines de cellules et de surveiller leur réponse en temps réel, comme la division cellulaire et le temps de réponse, en utilisant des techniques d'imagerie par fluorescence.

Le projet de recherche présenté dans cette section propose en outre de développer cette technologie en améliorant l'installation existante.

### Une approche générique mais des applications dépendantes des microorganismes : sélection des modèles biologiques

Pour valider le développement méthodologique de la plateforme que nous avons baptisé SCUBA (pour *Single-Cell to Understand BioReactors*), trois applications pertinentes ont été sélectionnées pour des actions déployées du court-terme au long-terme : (i) un modèle eucaryote bien connu, *Saccharomyces cerevisiae* (**Sc**), (ii) le procaryote *Bacillus thuringiensis* (**Bt**) comme candidat biopesticide industriel, (iii) l'eucaryote *Yarrowia lipolytica* (**Yl**) utilisé dans la production de biocarburants de troisième génération. Un quatrième modèle est actuellement en cours d'étude avec le projet Phy4FUN (thèse de Thao-Anh Nguyen) avec des champignons filamenteux (*Talaromyces*, *Trichoderma* et *Aspergillus*) utilisés dans la valorisation des agro-déchets lignocellulosiques. Ce dernier cas ne sera pas décliné sur cette partie et sera décrit juste après comme objet d'application en cours d'étude.

#### Modèle biologique de référence : *Sc. Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* a une importance commerciale significative dans les industries alimentaires et des boissons (production de boissons fermentées et de pains, altération des aliments et des boissons, traitement des déchets alimentaires, production d'ingrédients alimentaires comme probiotique, production d'éthanol industriel). *S. cerevisiae* a été développé comme un organisme modèle eucaryote pour plusieurs raisons (faible coût, robustesse de culture). L'objectif de ce modèle biologique est de valider rapidement la plateforme expérimentale en s'appuyant sur la large documentation de ce microorganisme pour les résultats expérimentaux tels que le temps de division cellulaire, le temps de réponse à un environnement nouveau et/ou fluctuant, et la quantification du transfert de masse cellulaire.

#### Modèle biologique eucaryote : *Yl. Yarrowia lipolytica*

La levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* est isolée de produits laitiers tels que les fromages, les yaourts et les saucisses, ainsi que des milieux pollués par l'huile ou des environnements marins et hypersalins [131]. De nombreux champignons ont la capacité de croître sous forme de levure, de pseudo-hyphes ou d'hyphes [132]. La plasticité morphologique permet aux champignons de s'adapter et d'envahir de nouveaux environnements en réponse aux conditions externes. Cette caractéristique, bien qu'essentielle pour les champignons dans les environnements naturels, peut poser des problèmes pour leur utilisation en milieu industriel, comme la culture en bioréacteurs. Le changement morphologique entre la croissance sous la forme cellulaire et en hyphes peut être initié par des indices nutritionnels, de pH, de température et d'osmolarité [133, 134]. L'utilisation industrielle des levures dimorphiques présente un défi particulier, car l'efficacité économique maximale exige que les bioréacteurs fonctionnent à haute température et osmolarité en utilisant des nutriments de faible qualité, pouvant initier la transition mycéliale, non désirée.

Le objectif d'utiliser ce modèle biologique **Yl** est de modéliser la morphologie microbienne (cellules individuelles, pseudo-mycélium ou vrai mycélium) en tenant compte des phases successives de culture (croissance oxydative, limitation et carence).

#### Modèle biologique procaryote : *Bt. Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* est une bactérie sporulante à Gram positif anaérobie facultative, déjà décrite précédemment. Brièvement, elle est fréquemment utilisée dans la production de certains biopesticides et comme source de gènes pour l'expression transgénique dans les plantes [135]. *B. thuringiensis* s'est avéré toxique pour divers organismes (insectes, vers, etc.), mais est considéré comme sûr pour les mammifères. Ainsi, les produits à base de *B. thuringiensis* fournissent un contrôle efficace et respectueux de l'environnement de plusieurs insectes dans les applications agricoles, forestières et de vecteurs de maladies [136]. Cette activité insecticide est principalement due à la production d'inclusions intracellulaires (appelées  $\delta$ -endotoxines) pendant la phase de sporulation des cellules de *B. thuringiensis*. La plupart des biopesticides distribués dans le monde sont principalement basés sur la souche *Bt kurstaki* HD1. En raison des nombreux changements de la physiologie cellulaire pendant le bioprocédé de production



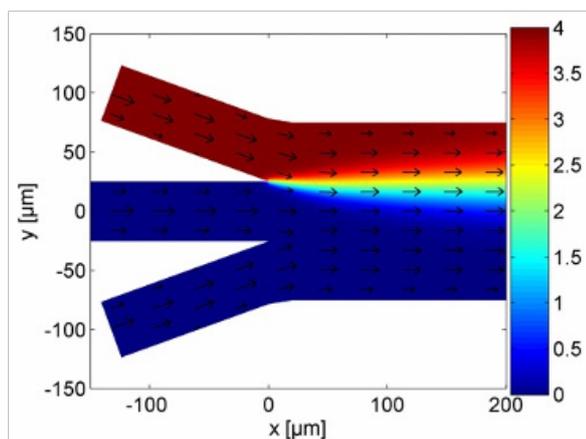


FIGURE 3.4 – Simulation d'un microsysteme fluide avec un profil de concentration en glucose (haute concentration vers le rouge) [102]

améliorations pour suivre le métabolisme unicellulaire en temps réel, comme la spectroscopie Raman et/ou la spectrométrie de masse.

**ii - Simulations CFD.** Afin de concevoir la cellule d'écoulement microfluidique et de déterminer correctement les champs de vitesse et de pression ainsi que les champs scalaires transportés et les gradients associés de la couche de convection-diffusion (concentration, pH et température), une étude de dynamique des fluides numérique (CFD) est envisagée dans différentes conditions de fonctionnement à l'aide du logiciel COMSOL (couplé aux boîtes à outils Multiphysics et Génie chimique), comme illustré à la figure 3.4. En outre, la simulation CFD sera poursuivie par une analyse (1) de l'effet de mélange dû à l'oscillation d'une particule (microorganisme) dans le fluide et (2) du temps transitoire nécessaire à la stabilisation des concentrations après une impulsion du fluide (un profil en escalier) et enfin (3) après des impulsions périodiques (appelées ici fluctuations).

Cette étude, au coeur de l'expertise de l'équipe TIM [112, 137] permettra de cadrer les conditions locales du micro-environnement du microorganisme et sera une aide au design de puce microfluidique décrit ci-après.

**iii - Couplage microfluidique et fluorescence à la plateforme HOT.** Cette tâche consistera à concevoir une puce microfluidique entièrement contrôlée qui sera intégrée au système HOT (tâche i-). Nous avons déjà travaillé avec la micro-millifluidique mais plusieurs collaborations sont déjà initiés avec nos partenaires en microsystemes (LAAS-CNRS, Institut Clément Ader de l'INSA et le Laboratoire de Génie Chimique). Chacun offre des spécificités propres (lithographie douce sur SU-8 et PDMS, ostomère, gravure sur silicium etc.). L'appui technique en local dans l'équipe permettra également d'intégrer mécaniquement les accessoires. Dans le cadre de cette tâche, nous ajusterons également le système d'imagerie qui sera nécessaire pour le WP suivant (sources d'excitation LED, caméra sensible s-CMOS). Le dispositif actuel permet déjà l'imagerie fluorescence en simultané avec le piégeage. L'objectif ici est de proposer une détection avec une meilleure résolution et un traitement en temps réel (analyse de descripteurs morphologiques et intensité de fluorescence).

#### iv- Analyse des verrous et mesures d'atténuation

**Développement du système HOT.** le niveau de risque est modéré étant donné que la technologie est désormais bien établie dans le monde entier et que nous avons l'expertise en matière de construction optique et d'imagerie. La pince optique à piège unique pour la mesure de la force est actuellement opérationnelle (banc optique interne, programme de contrôle et d'acquisition personnalisé). Pour passer à la configuration HOT, il suffit d'ajouter une extension du banc optique (générateur d'hologramme SLM, deux

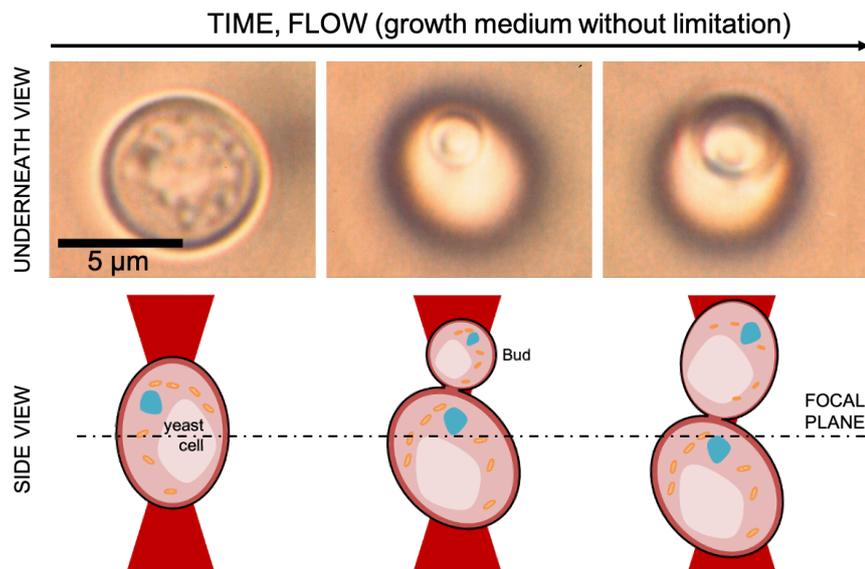


FIGURE 3.5 – Suivi du processus de bourgeonnement d’une seule levure piégée à une puissance de 110 mW et sous flux hydrodynamique à 500 nl/min.

cubes séparateurs de faisceau polarisant, et une lentille positive). Le logiciel pour les hologrammes de phase est disponible gratuitement auprès de l’entreprise (par exemple Hamamatsu) ou des groupes de recherche (par exemple le groupe de Miles Padgett au Royaume-Uni).

**Photodégradation.** Plusieurs travaux ont démontré que le faisceau laser pouvait endommager les cellules piégées en fonction de la longueur d’onde et de la puissance. Une étude sur *S. cerevisiae* a montré qu’une cellule de levure piégée à 110 mW à 810 nm pouvait poursuivre sa division en condition statique [16]. Un résultat préliminaire (voir figure 3.5) sur le dispositif existant peut démontrer que des cellules de levure uniques piégées (puissance laser à 110 mW et  $1064 \mu\text{m}$ ) peuvent suivre un processus de bourgeonnement assez rapide sous flux avec un canal microfluidique en forme de Y (moins de 2 heures, par rapport à 5 heures en condition statique).

**Simulation microfluidique à l’aide de la CFD.** Simulation microfluidique à l’aide de la CFD : le groupe TIM possède l’expertise nécessaire pour mener à bien cette tâche, comme le prouve un grand nombre de projets numériques.

**Ressources en soutien technique.** Plusieurs actions ont été lancées pour sécuriser le plein développement de cette tâche notamment par l’embauche de deux jeunes ingénieurs : (i) un IR CNRS CDD 1 an depuis septembre 2024 qui aura pour tâche d’optimiser le système optique (réduction aberration optique), développer la technologie HOT et suivi vidéo par analyse d’image. (ii) un IE INSA CDD 1 an depuis octobre 2024 qui sera dédié au projet Flux4ONE (décrit ci-après) en collaboration avec la plateforme FluxoMET de TBI et consistera à développer une nouvelle interface Homme-Machine de contrôle-acquisition et le multiplexage avec le spectromètre de masse haute-résolution de la plateforme.

## WP2. Transfert de masse $\mu\text{LIF-I}$ en cellule unique

Ce volet vise à mettre en œuvre les techniques établies et développées dans l’équipe TIM pour la visualisation du transfert de masse à l’aide de colorants fluorophores. Une technique de fluorescence a été mise au point pour visualiser la concentration d’oxygène dissous, en

utilisant l'oxygène comme inhibiteur de fluorescence de l'acide pyrobutyrique [138] ou du complexe de ruthénium [139] (Planar Laser Induced Fluorescence with Inhibition : PLIF-I), et la concentration de dioxyde de carbone, en utilisant un colorant fluorescent sensible au pH [140]. Ces techniques ont été appliquées séparément à une grande variété d'interfaces gaz-liquide : interface plane, [141-144], interface ondulée [145, 146], bulle ascendante entre deux plaques [147, 148], bulle en mouvement et confinée dans des canaux millifluidiques [149-151] et bulle ascendante dans une colonne [152-159]. La plupart de ces techniques sont basées sur l'utilisation d'une nappe laser 2-D et seules des techniques *pseudo*-3D ont été réalisées [160], soulignant la complexité de mesure de la concentration de gaz dissous dans le sillage des bulles. Les longueurs d'onde d'excitation de ces colorants fluorescents se situent dans une plage étroite de 350 nm à 480 nm. Ces outils seront ici appliqués dans des puces microfluidiques produites par le WP1 autour de micro-organismes vivants éclairés par des LED à la longueur d'onde d'excitation requise.

**i- Fluorescence induite par micro-laser avec inhibition ( $\mu$ -LIF-I).** Dans un premier temps, la technique sera appliquée à un écoulement monophasique dans des puces microfluidiques afin de valider la mesure de la fluorescence et/ou d'adapter la puissance d'excitation de la source lumineuse. Des solutions, initialement saturées en oxygène ou en dioxyde de carbone, seront utilisées.

**ii- Caractérisation et calibration des marqueurs.** A partir de l'image acquise ci-dessus, une moyenne statistique sera éditée pour chaque marqueur, chaque concentration du colorant, et chaque concentration de l'inhibiteur de fluorescence ( $O_2$ , température, pH etc.). Pour l'inhibition de la fluorescence (mesure du champ de concentration en oxygène), l'équation de Stern-Volmer sera utilisée [161] et la loi de Beer-Lambert pour la mesure directe de la fluorescence (pH ou température) [162].

**iii- Test sur le micro-organisme modèle *S. cerevisiae*.** Les cellules seront immobilisées par HOT. Le flux autour des cellules sera contrôlé en pression (générateur de pression) afin d'appliquer différentes valeurs de contrainte de cisaillement au micro-organisme. Les limites du piégeage par la force optique sont atteintes à 1  $\mu$ l/min en débit, avec échappement de la particule au-delà de cette limite (pour un canal de 100  $\mu$ m de largeur et 50  $\mu$ m de profondeur et une levure de 6  $\mu$ m de diamètre). La concentration de chaque espèce étudiée (c'est-à-dire  $O_2$ ,  $CO_2$ , pH) dans le liquide sera modifiée afin d'étudier son impact sur le micro-organisme et le rendement de la réaction biochimique. Typiquement, des gammes sont de 0,1 à 50 mg/L pour l' $O_2$ , de 0,1 à 2 g/L pour le  $CO_2$  et de 3 à 11 pour le pH.

Un système adéquat d'acquisition et de traitement d'images sera développé et des procédures d'étalonnage *ad hoc* seront définies sur la base des données générées dans le cadre de la tâche ii-. Des distributions de temps de résidence bien définies des espèces autour de la cellule seront obtenues, permettant une étude détaillée de la consommation/production des espèces, visualisée en fonction du stress, des propriétés du fluide et d'une éventuelle limitation de l'un des gaz/espèces d'intérêt. Cette action vise à clarifier et à comprendre la réponse de la cellule à des conditions environnementales données.

#### **iv- Analyse des verrous et mesures d'atténuation**

Le principal verrou ici est la **limite de détection de l'oxygène, du dioxyde de carbone et du pH** via les marqueurs fluorescents dédiés. La preuve de concept à l'échelle de la cellule unique est encore à l'étude. Ce que nous savons, c'est que la détection à l'échelle de la cellule unique est possible (voir figure 3.6 ci-dessous) et qu'elle fournira un temps de réponse mesurable. Le défi de ce projet est donc la quantification de la concentration.

La limite de détection du niveau LIF-I pour l'oxygène, par exemple, est d'environ 0,1 mg/L. Nous savons que, par exemple, *Escherichia coli* consomme 0,9-0,23  $mol.kg^{-1}.h^{-1}$  ( $qO_2$ ), ce qui

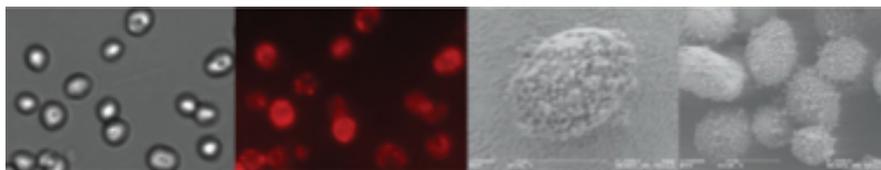


FIGURE 3.6 – Nanocapteurs d’oxygène à partir de nanoparticules fonctionnalisées au Ruthénium attachés à la surface de *Saccharomyces cerevisiae* [163].

donne quelques femtogrammes d’oxygène dans le volume d’observation de quelques picolitres, soit une concentration de quelques mg/L, ce qui est supérieur à la limite de détection. En outre, les images de fluorescence peuvent être optimisées grâce aux paramètres d’imagerie (excitation, temps d’exposition et sensibilité de la caméra). Grâce à l’expérience de l’équipe en matière d’imagerie, de traitement d’images et de technique LIF-I, cette action présente néanmoins un verrou qu’il est possible de lever.

Il est donc proposé de : (i) Augmenter l’excitation ; si la source de lumière LED n’est pas assez puissante, un laser (532 nm) sera utilisé à la place, la concentration du marqueur sera augmentée et une longueur d’onde d’excitation plus précise sera choisie. (ii) Si les courbes d’étalonnage ne sont pas linéaires, un filtre optique spécifique avec une faible déviation sera utilisé pour améliorer l’applicabilité de la loi de Beer-Lambert ; et iii) si le signal émis autour de la cellule n’est pas suffisamment élevé pour être mesuré, l’acquisition et le temps d’exposition du dispositif optique seront augmentés ou le micro-organisme sera remplacé par une espèce plus productive.

### WP3 : Croissance cellulaire et division

Nous avons vu plus haut que les hétérogénéités dans les bioréacteurs industriels affectent les paramètres de culture fondamentaux tels que le taux de cisaillement, les concentrations d’oxygène dissous, les concentrations de substrat, le pH, la température et la pression osmotique. La nature, l’intensité, la durée et/ou la fréquence du stress rencontré seraient responsables de différents comportements cellulaires conduisant ainsi à la génération de variabilités phénotypiques au niveau de la population [164-166]. Cela entraînerait des variations de performance en termes de rendement et/ou de productivité dans les bioréacteurs industriels par rapport aux bioréacteurs à petite échelle [88, 89, 94, 167].

Par conséquent, l’identification et la quantification des impacts de ces fluctuations sur la dynamique microbienne sont nécessaires pour atteindre des performances optimales au niveau industriel. Par exemple, le gradient de pH est présent pendant presque toute la durée des cultures. Des valeurs de gradients de pH allant jusqu’à 2 unités et de temps de séjour (jusqu’à 240 s) sont rapportées et augmentent avec le volume du bioréacteur [96, 168-170]. Ce WP3 propose de lever ces verrous scientifiques en explorant des niveaux de complexité successifs et croissants (tâche i- : croissance et division ; tâche ii- : transition mycéliale et tâche iii- : sporulation et lyse cellulaire). Toutes les tâches seront menées avec les modèles biologiques cités précédemment (voir figure 3.7). En outre, les variations proposées suivront ici un profil de type créneau (*Heaviside*), montante (*top-up*) ou descendante (*top-down*) avec des spécificités applicables aux modèles biologiques concernés (*Sc*, *Yl* ou *Bt*).

#### i- Croissance et division cellulaire en condition de culture oxydative

Le volume cellulaire est un paramètre important pour la modélisation mathématique des processus métaboliques cellulaires [171]. Les cellules sont des particules tridimensionnelles et sont donc caractérisées par une surface à travers laquelle les processus d’échange/transport (c’est-à-dire les flux métaboliques) se produisent entre les volumes extra- et intracellulaires. D’un point de vue physico-chimique, un flux de matière ( $J$ ) à travers la membrane cellulaire est un taux de flux d’une propriété par unité de surface ( $mol.m^{-2}.h^{-1}$ ). Toutefois, en raison

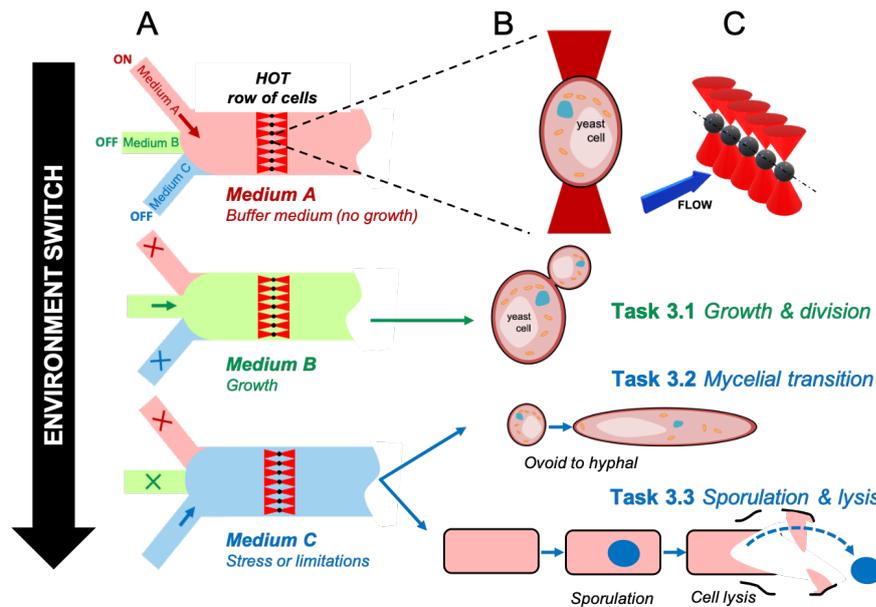


FIGURE 3.7 – Exemple d’analyse de la transition levure-hyphes de *Yarrowia lipolytica* lorsqu’elle est exposée à un environnement différent en utilisant la microfluidique (encart A) pour suivre toute modification morphologique (encart B) des cellules piégées, disposées sur une rangée pour faire face au flux de manière égale (encart C).

du manque d’informations sur les propriétés volumétriques des objets biologiques, les flux d’entrée et de sortie de la biomasse microbienne sont généralement exprimés en unités de taux spécifiques de la biomasse ( $r$ ) ( $mol.(gCDW.h)^{-1}$ ); CDW : poids sec cellulaire), qui sont habituellement mesurés dans les expériences à l’échelle de l’échantillonnage (population de cellules). La capacité à extraire des informations fiables permettant de modéliser les taux spécifiques de croissance (masse, volume, nombre) tout au long de la durée de vie de la cellule, y compris l’évolution de la masse/du volume et le nombre de bourgeons par cellule, doit être démontrée. La plateforme HOT (cf. WP1) permettra de piéger plusieurs cellules individuelles sur une rangée, face au flux, comme le montre la figure 3.7. Une fois immobilisées, les expériences seront menées dans les conditions suivantes :

- Souche eucaryote (*Saccharomyces cerevisiae*, ATCC) et milieu de culture synthétique,
- Mode de culture : réacteur continu avec cellules immobilisées (jusqu’à 50 cellules),
- Conditions de culture nominales : pH=6, T=30°C,  $pO_2 > 25\%$  de saturation  $pO_2$ .

#### ii- Transition cellulaire mycéliale induite par un changement de pH (*Heavyside*)

Le modèle *Yl Y.lipolytica* est une levure non conventionnelle, importante sur le plan industriel (biotechnologie blanche et alimentaire) avec des caractéristiques physiologiques et métaboliques distinctes en réponse aux conditions environnementales [172]. Une variété de facteurs externes (par ex, pH, température et disponibilité des nutriments) influencent le comportement de la levure et peuvent agir comme des conditions de stress auxquelles les cellules doivent résister et s’adapter [167, 173, 174]. Jusqu’à présent, la caractérisation de la transition mycéliale de *Y. lipolytica* au niveau de la cellule unique, y compris un traitement statistique (et l’histoire de la cellule) par l’analyse des profils de distribution de la taille des cellules et du transfert de masse environnant, n’a jamais été prise en compte. Une telle approche peut fournir une description réaliste de l’hétérogénéité morphologique de la culture et permet la sous-catégorisation de la population microbienne en forme cellulaire (cellules uniques ovoïdes ou sphériques) et filamenteuses (cellules allongées et pseudo-mycéliums). Les expériences seront menées dans les conditions suivantes :

- Souche eucaryote (*Y. lipolytica* W29, ATCC) et milieu de culture [131],
- Mode de culture : réacteur continu avec cellule immobilisée (jusqu'à 50 cellules),
- *Heaviside* top-down (pH=5,6 ↘ 4,1) et top-up (pH=5,6 ↗ 7,1) générant un changement de pH soudain.
- Conditions de culture nominales : pH=5,6, T=28°C,  $pO_2 > 25\%$  de saturation  $pO_2$ .
- Paramètres suivis : paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité, glucose,  $pO_2$ ), granulométrie et morphologie de la cellule.

### iii- De la sporulation à la lyse cellulaire induite par une limitation nutritionnelle (*Heaviside*)

Le biopesticide est une alternative écologique aux pesticides chimiques nocifs. *Bacillus thuringiensis* est une souche procaryote Gram positive sporulante que l'on trouve dans l'environnement. Pendant sa phase de sporulation, induite par une limitation nutritionnelle (changement environnemental), il produit des endotoxines qui sont responsables de la production de biopesticides<sup>1</sup>[175, 176]. En raison de plusieurs changements de la physiologie cellulaire pendant le bioprocessus de production d'endotoxines (croissance exponentielle, formation d'inclusions, formation de spores, lyses), la culture de Bt est considérée comme un processus laborieux. Depuis 2017, ce modèle biologique a été expérimenté dans notre équipe (Projet IPM-4-Citrus, <https://www.ipm-4-citrus.insa-toulouse.fr/> et PHC-Utique B4G 2022-2025). Bien qu'une possibilité d'optimiser la culture de Bt repose sur une meilleure connaissance de son évolution physiologique au niveau cellulaire. En outre, les modèles dynamiques [84] pour décrire et évaluer la croissance, la sporulation et la lyse de Bt doivent être conduits au niveau cellulaire pour affiner les taux spécifiques et leurs distributions statistiques.

Les expériences seront menées dans les conditions suivantes :

- souche procaryote (*Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki* Lip [177], et milieu de culture [175],
- Mode de culture : réacteur continu avec cellule immobilisée (jusqu'à 50 cellules),
- Conditions de culture : pH6,8, 30°C,  $pO_2 > 25$
- Passage soudain d'un milieu semi-synthétique [175] à une limitation nutritionnelle (sans sources de carbone et d'azote).
- Conditions de culture : pH=6,8, T=30°C,  $pO_2 > 25\%$  de saturation  $pO_2$
- *Heaviside* top-down (standard à zéro),

### iv- Analyse des verrous et mesures d'atténuation

Étant donné que les souches microbiennes sont bien connues et déjà utilisées au sein de notre équipe, ce point semble présenter un risque mineur. La validation du dispositif expérimental est l'étape la plus difficile par rapport aux WP1 et WP2. Toutefois, même si le verrou concernant le transfert de masse par  $\mu$ LIF-I venait à ne pas aboutir, le suivi morphologique caractéristique reste un aspect de ce WP relativement bien maîtrisable.

## WP4. Réponse physiologique de la cellule face aux fluctuations de son environnement

Le WP4 revêt une importance centrale dans le projet SCUBA. Il bénéficie directement des efforts expérimentaux réalisés dans les WP1, 2 et 3 (développement HOT, simulations microfluidiques, configuration et calibration de la fluorescence à l'aide de la technologie LIF-I, suivi de la croissance cellulaire, de la division, des changements morphologiques et du transfert de masse à l'échelle cellulaire pour une condition donnée).

Le WP4 se concentre désormais sur le comportement des cellules lorsqu'elles sont exposées à des fluctuations soudaines de leur environnement et visualise directement leur réponse physiologique (morphologie et transfert de masse). Par analogie avec les transferts électriques,

1. Small-scale processing of microbial pesticides, <https://www.fao.org/3/t0533e/t0533e00.htm>

mécaniques et thermiques soumis à des excitations périodiques, notre équipe propose d'explorer les réponses physiologiques spectrales des micro-organismes exposés à un facteur (pH) dont la modulation (régime périodique) sera définie par sa fréquence ( $t$ -impulsion, et  $t$ -impulsion +  $t$ -repos) et son intensité (amplitude).

Comme introduit dans le WP3, *Yarrowia lipolytica* (souche eucaryote) a été identifié comme un micro-organisme important en raison de ses caractéristiques biochimiques et de ses applications prometteuses. Le pH est un facteur bien identifié qui induit sa transition mycéliale. Le modèle biologique biologique *Y. lipolytica* sera exposé à un stress de pH. Les modifications morphologiques induites (transition mycéliale) ainsi que l'activité métabolique (production de CO<sub>2</sub>) seront surveillées. Des fluctuations temporelles réalistes du pH (gradients de pH allant jusqu'à 2 unités, impulsions temporelles allant jusqu'à 240 s) dans un bioréacteur industriel peuvent être envisagées pour des recherches supplémentaires. Notre équipe propose une approche innovante pour comprendre ce que rencontrent réellement les cellules individuelles dans un grand bioréacteur. Une telle réponse physiologique sera détectée via le transfert de masse des cellules (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) et la morphologie des cellules. La Figure 3.8 illustre la philosophie de ce travail expérimental ultime. Il consiste à moduler une modification périodique des conditions environnementales (pH) vécues par la cellule. L'interprétation des données, le traitement statistique et la modélisation incluront les taux spécifiques d'oxygène, de dioxyde de carbone et de croissance, ainsi que les biocinétiques décrivant les changements morphologiques. Le défi expérimental sera de discriminer un temps d'exposition critique (impulsion de temps) et une fréquence critique d'excitation ( $1/f_c = t_{impulsion} + t_{repos}$ ) induisant une transition mycéliale et affectant les taux spécifiques des cellules.

- i- Déviation par rapport aux conditions idéales** Pour initier le WP4, les fluctuations seront mises en place selon un schéma périodique en implémentant le programme de contrôle de la plateforme HOT afin de déplacer les micro-organismes dans et hors d'un milieu donné avec des propriétés spécifiques (pH, oxygène, nutriments) et une hydrodynamique modélisée dans la tâche WP1.ii. Cette tâche est relativement triviale puisque l'expertise est déjà présente dans le groupe et peut être effectuée à court terme. Cette action produira des données expérimentales. Pour intégrer les fluctuations des environnements physico-chimiques autour de la cellule unique (déviation par rapport au cas idéal - impulsion de forme carrée parfaite), le déplacement de la cellule du premier milieu (conditions nominales) au second milieu (conditions de stress) sera exploré par simulation CFD (interaction avec WP1 et WP5).
- ii- Balayages de fréquence et d'amplitude de pH** Enfin, les réponses physiologiques spectrales des micro-organismes seront explorées par le balayage de fréquence. La fréquence est définie par la période d'excitation incluant  $t$ -impulsion et  $t$ -repos (figure 3.8). Une référence ( $t$ -impulsion = 240 s) et un gradient maximal de pH (2 unités de pH) seront supposés en tenant compte des données de la littérature. Si aucune déviation n'est observée, la robustesse de la souche sera démontrée. Si une déviation physiologique est observée, une fréquence critique d'excitation ( $1/f_c = t_{impulsion} + t_{repos}$ ) et l'intensité du facteur seront examinées dans la tâche WP4-ii. En tenant compte de la fréquence critique précédemment identifiée, le balayage d'amplitude de pH sera exploré. Les objectifs seront de déterminer une plage de conditions opératoires dans lesquelles la tolérance de la souche peut être assumée.
- iii- Analyse des verrous et mesures d'atténuation** Plusieurs problèmes doivent être résolus dans le cadre du WP2, et un jalon doit être atteint dans la tâche WP2-iii (suivi du transfert de masse avec activité biologique). La gestion des risques pourrait contribuer à poursuivre cet aspect original du projet et à visualiser le transfert de masse des cellules (via des marqueurs fluorescents pour observer les variations de pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, glucose et température).

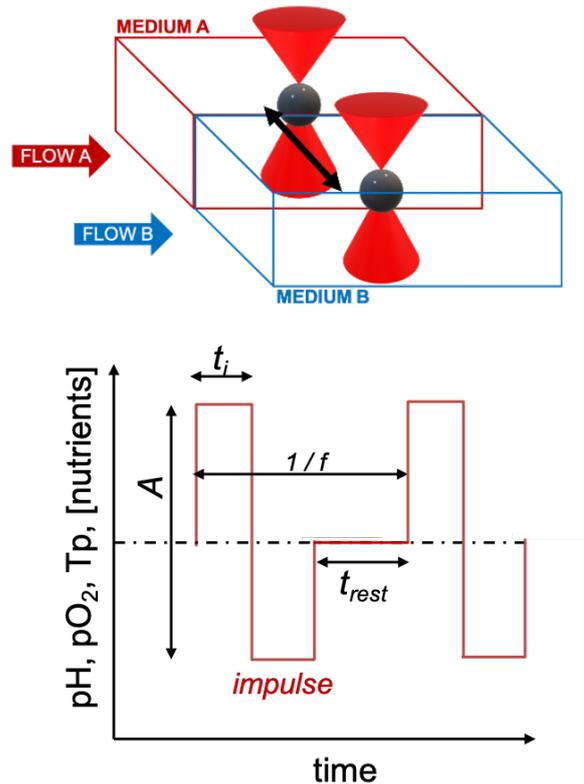


FIGURE 3.8 – Une cellule individuelle peut être manipulée en utilisant HOT pour passer d’un milieu A à un milieu B par un mouvement oscillant périodique. La cellule est ainsi soumise à une impulsion périodique de certaines conditions environnementales (pH, oxygène, température, nutriments) au fil du temps, en modulant l’amplitude ( $A$ ), la fréquence ( $f$ ), la durée de l’impulsion ( $t_i$ ) au-dessus ou en dessous d’une condition de référence (ligne pointillée), et la durée de repos ( $t_{rest}$ ).

L'objectif global du WP4 est de définir une approche générique pour caractériser les performances de la souche et évaluer leur robustesse face aux fluctuations dans des conditions industrielles réalistes (couplage avec CFD du schéma d'écoulement et des fluctuations environnementales dans le temps et l'espace).

#### **WP5. Intégration et *scale-up***

Les données expérimentales issues des cellules individuelles du WP2 au WP4 seront implémentées en utilisant la taille, le taux d'élongation, les capacités d'absorption et de croissance comme variables internes dans un modèle de bilan de population multidimensionnel [117]. Le couplage d'un modèle de population multidimensionnel et/ou d'un modèle dynamique métabolique avec les équations d'écoulement des fluides constituera une avancée majeure dans le domaine de la simulation prédictive des bioréacteurs. Une large gamme de phénomènes et d'échelles temporelles doit être considérée simultanément afin de proposer une vision conceptuellement pertinente qui explique la logique derrière les observations et dépasse leur simple description mathématique.

- i- De la cellule unique à l'échelle de la population** Dans cette tâche, nous allons extraire des informations des expériences pour alimenter les noyaux du modèle de bilan de population (division et répartition). En plus de la fonction de distribution, nous sommes particulièrement intéressés à identifier la constante de temps de la réponse biologique à des changements soudains. Il est attendu que la dynamique puisse être classée selon sa constante de temps respective, ce qui fournit déjà une vision couplée de la réponse de la cellule à son environnement.
- ii- Modèle cinétique** La modélisation cinétique est nécessaire pour décrire avec un haut niveau de précision la biochimie d'une voie métabolique, en utilisant une expression cinétique pour les taux de réaction. Cependant, l'introduction des concentrations réelles dans le modèle nécessite de prendre en compte les changements de volume de la cellule pendant sa croissance. De plus, la répartition des métabolites et du matériel cellulaire lors de la division doit être spécifiée. Notre objectif dans cette tâche est de comparer l'approche cinétique à l'approche métabolique afin de mieux comprendre laquelle est la plus adaptée à l'analyse des données expérimentales.
- iii- Du modèle de bilan de population au bioréacteur** Dans cette tâche, la question clé est de développer une méthodologie permettant le transport d'un modèle de bilan de population multivarié. Lors des études précédentes de l'équipe, des approches de volumes finis, des méthodes de moments et une approche hybride combinant les deux ont été développées. Cependant, les limitations dues au nombre de variables n'ont pas pu être surmontées [117]. En revanche, nous proposons ici d'utiliser une approche Monte-Carlo pour résoudre l'équation de bilan de population, ainsi qu'un modèle stochastique pour le transport de particules numériques imitant la cellule. Le réacteur est divisé en un sous-ensemble de compartiments, le flux entre eux est soit défini manuellement, soit extrait des calculs CFD. Le transport des particules lui-même est traité comme un processus markovien, la matrice de transition étant calculée à partir de la matrice des débits [98].
- iv- Analyse des verrous et mesures d'atténuation** Le modèle métabolique devient difficile à construire lorsqu'on prend en compte les changements morphologiques du micro-organisme, en particulier pour *Y. lipolytica*, dont la transition mycélienne peut introduire une complexité supplémentaire. Dans ce projet, un modèle métabolique a été développé dans l'équipe TIM [178]. Le risque est donc négligeable, car en plus, le modèle de bilan de population couplé avec la CFD dans un bioréacteur est désormais opérationnel [108] et nécessite uniquement d'être adapté à ce micro-organisme.

### 3.3.3 Compréhension de l'impact des déterminants morpho-physiques de champignons filamenteux et de leur secrétome cellulolytique dans la dégradation de co-produits agro-industriels par des approches de la cellule unique au bioréacteur - projet Phy4FUN

Je vous ai présenté le projet SCUBA, le résultat d'une réflexion sur la modélisation de l'hétérogénéité dans les bioréacteurs par des approches de cellules uniques, transposable vers les échelles du bioréacteur avec les outils numériques, en intégrant les compétences propres de l'équipe TIM. Depuis moins d'un an, j'ai lancé une première action sur cette thématique avec la thèse de Thao-Ahn Nguyen (projet Phy4FUN) concernant l'utilisation de champignons filamenteux pour valoriser les agro-ressources, en déployant les approches énoncées juste avant.

Il est estimé que les réserves de pétrole mondiales vont s'épuiser en moins de 50 ans au rythme actuel de consommation. Dans ce contexte, notre capacité à développer une bioéconomie durable basée sur le recyclage du carbone (biomasse) est déterminante. La biomasse lignocellulosique est considérée comme une ressource durable prometteuse pour produire des produits chimiques et de l'énergie afin de remplacer les ressources fossiles. Il s'agit d'une structure complexe composée de lignine (25-30%), d'hémicellulose (25-30%) et de cellulose (35-50%) [179, 180]. Pour utiliser ce substrat complexe, les enzymes ont été identifiées comme un facteur important de ces processus. Cependant, le coût des enzymes a été estimé à jusqu'à 0,82 euro/L de bioéthanol selon les enzymes spécifiques utilisées dans l'hydrolyse enzymatique. Une alternative potentielle pour surmonter cet obstacle est un processus intégré de production d'enzymes et de fermentation de bioproduits. En effet, une grande variété de microorganismes, y compris les champignons et les bactéries, a été reconnue pour leur capacité à hydrolyser les matériaux lignocellulosiques [181, 182]. En particulier, les champignons filamenteux jouent un rôle crucial dans la dégradation de la majorité de la biomasse dans la nature. La production d'enzymes pourrait être réalisée par l'intégration de la culture de champignons sur un substrat lignocellulosique et son hydrolyse par fermentation submergée en bioréacteur. Les protéines brutes sécrétées dans les moûts de fermentation, appelées "secrétome", pourraient être directement utilisées pour l'hydrolyse de la lignocellulose.

Comme chez *Yarrowia lipolytica* vu plus haut, l'état morphologique des champignons filamenteux a un impact important sur la performance du processus de culture. Dans la fermentation submergée, les champignons filamenteux se développent soit sous forme de granules sphériques, constitués d'une agrégation compacte d'hyphes, soit sous forme filamenteuse, caractérisée par une dispersion homogène des hyphes. Une croissance sous forme de mycélium libre, avec une concentration élevée de biomasse fongique, entraîne une viscosité élevée des milieux de fermentation, ce qui pose des difficultés de transfert de masse gaz-liquide, de mélange liquide et de rhéologie complexe. La croissance des champignons sous forme de granules pourrait être la morphologie souhaitable pour le processus de fermentation, car elle réduit la viscosité du milieu et la possibilité d'enchevêtrement des filaments autour des agitateurs, améliorant ainsi la rhéologie de la culture en favorisant le transfert de masse et d'oxygène et en réduisant la consommation d'énergie pour l'aération et l'agitation.

Au cours de la fermentation, l'état morphologique de champignons filamenteux dépend de divers facteurs dans le processus complexe d'interactions de la fermentation. Les conditions culturelles (nutriments du milieu, taille de l'inoculum, pH du milieu, niveau d'oxygène dissous, additifs polymériques, oligo-éléments, niveaux d'azote et de phosphate, CO<sub>2</sub>, température, présence d'agents de nucléation, polymères biodégradables), le système et le fonctionnement du bioréacteur (agitation, types de bioréacteurs, géométrie des fermenteurs, rhéologie, modes de culture, etc.) sont rapportés comme influençant la formation des granules. De plus, la présence de substrats lignocellulosiques solides dans le bioréacteur peut également affecter la morphologie des granules en raison des forces de cisaillement pendant l'agitation. D'une part, les champignons produisent un mélange d'enzymes pour hydrolyser le substrat solide. Les composants enzymatiques dans le mélange d'enzymes changent en fonction du substrat et du prétraitement utilisés. D'autre part, les enzymes hydrolysent et modifient la morphologie des

No.	Collection
1	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30
2	<i>Trichoderma virens</i> FEC 118
3	<i>Trichoderma virens</i> FEC 161
4	<i>Trichoderma harzianum</i> FEC 40
5	<i>Trichoderma harzianum</i> FEC 142
6	<i>Trichoderma harzianum</i> FEC 147
7	<i>Trichoderma harzianum</i> FEC 383
8	<i>Aspergillus tubingensis</i> FEC 98
9	<i>Aspergillus niger</i> FEC 130
10	<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i> FEC 156
11	<i>Talaromyces</i> sp. BRG1

TABLE 3.1 – Souches présélectionnées pour le projet Phy4FUN provenant de la collection du FIRI [183]

fibres telles que la longueur et le diamètre, ce qui a indirectement un impact sur la morphologie des granules et la viscosité des moûts de fermentation. Chaque facteur a des effets variables sur les morphologies des champignons, parmi lesquels l’agitation et le transfert d’oxygène semblent être les plus pertinents. Il est nécessaire de comprendre et d’optimiser le bioprocessus car l’oxygène doit pénétrer dans les granules pour produire une enzyme cellulolytique et un fort cisaillement tend à désagréger et rompre les filaments.

Pour relever ce défi, le projet Phy4FUN s’appuie sur les concepts cités plus haut, avec le développement de la plateforme SCUBA, et propose de **réduire l’échelle du bioprocessus à la cellule individuelle** et de bénéficier de l’expertise du consortium en matière de microfluidique et de techniques d’immobilisation physique, notamment des pinces optiques combinées à une technologie d’imagerie par fluorescence. L’intégration des échelles pertinentes, de la cellule individuelle au bioréacteur, permettra de résoudre le problème de l’hétérogénéité. Cela peut être abordé en suivant la croissance et le changement morphologique des cellules individuelles lorsqu’elles sont exposées à un changement soudain/fluctuant de la composition du milieu, imitant ainsi les conditions d’un bioréacteur.

L’originalité du projet repose notamment sur l’accès à des souches lignocellulolytiques de la collection du FIRI à Hanoi au Vietnam pour lesquelles une analyse préliminaire a été publiée [183] sur substrat de paille de riz.

Ce projet, dimensionné *a minima* à l’échelle d’une thèse, s’articule selon la même logique décrite précédemment adapté aux contraintes et enjeux spécifiques de l’objet biologique. Ce projet fait l’objet de la thèse de Thao-Anh Nguyen (2023-2026), du projet M2 Alick Costa (2024) et M1 Aranzazu Merodio (2023).

### Caractérisation de souches et sélection des candidats

Une première étude consiste à pré-sélectionner plusieurs souches parmi un panel de souches environnementales (voir tableau 3.1), selon le crible de leur activité cellulolytique et xylolytique à partir de travaux publiés [183].

Dans cette partie, une méthode optique a été développée pour déterminer les descripteurs morphologiques de trois souches représentatives de leur genre (*Trichoderma virens* FEC 118, *Aspergillus niger* FEC 130, *Talaromyces* sp. BRG1) par une analyse statistique de critères associés tels que : la dimension et la distribution en taille en condition de culture submergée. Les caractérisations morphologiques ont été effectuées ex-situ à l’aide d’un morphogranulomètre (Mastersizer G3S, Malvern Instruments Ltd., logiciel Morphologi v7.21), incluant des observations microscopiques standardisées, une analyse d’images et un traitement statistique des critères extraits. La densité des pellets, la forme et la taille, les paramètres des fibres et

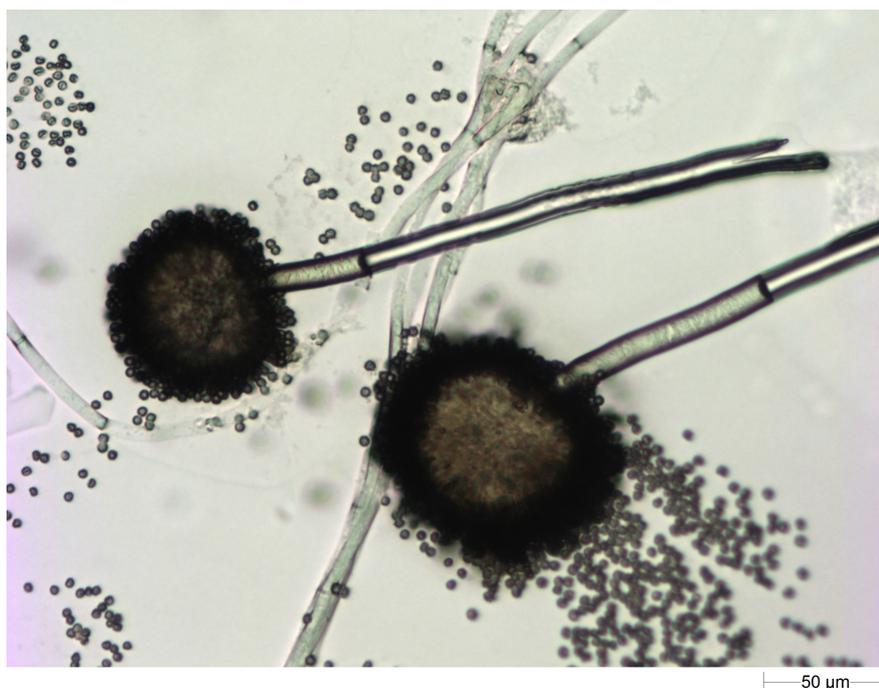


FIGURE 3.9 – *Aspergillus niger* FEC130 (collection FIRI [183]) cultivé en milieu solide (PDA), objectif x20, barre échelle 50 μm

les fonctions de distribution associées ont été corrélés à la biomasse afin de décrire la diversité de la morphologie des champignons filamenteux à différents stades de croissance. Les résultats indiquent que, dans des conditions submergées contrôlées, les trois souches sélectionnées présentent des structures de pellets différentes – allant de mycéliums dispersés à des pellets compacts – avec de grandes variations morphologiques (par exemple en figure 3.9).

Nos observations ont également permis de démontrer que la sporulation était possible voire abondante en condition de culture submergée, contrairement au postulat initial [184-186].

Un développement méthodologique plus poussé a été entrepris, au travers des projets M1 2023 (Aranzazu MERODIO) et M2 2024 (Alick COSTA) sur la souche *T. virens* FEC118, dont les résultats sont très brièvement présentés ci-dessous.

### Analyse morphologique de souches *T.virens* FEC118 en conditions de culture submergée vs. solide

Le phénotype morphologique des champignons filamenteux est un paramètre clé dans la conception des bioprocédés. Ces microbes sont devenus de plus en plus importants en raison de leur rôle dans l'hydrolyse lignocellulosique, et leur présence dans la fermentation industrielle doit être contrôlée et optimisée. Pour ce faire, la morphologie doit être reliée à la croissance de la biomasse et à la production de métabolites. La morphologie de *Trichoderma virens* FEC 118 a été étudiée à l'aide de l'analyse d'images et en tenant compte de deux conditions différentes : la culture en milieu solide et la culture submergée. Des questions techniques ont été abordées dans les deux cas, ce qui a permis d'observer la production des spores, la croissance des hyphes et la formation des granules. Dans la culture submergée, une analyse complète a été menée, établissant des liens entre la forme, la taille, la porosité et la croissance de la biomasse au cours d'une période de fermentation de 6 jours. Notamment, au cours de la phase exponentielle, une formation non coagulative de granules a été observée, conduisant à une agglomération ultérieure des granules. La phase stationnaire a été caractérisée par la présence de gros granules circulaires. En outre, l'impact de l'agitation sur la dégradation des granules a été observé. Cette étude met en lumière la relation complexe entre la morphologie

fongique et la dynamique de croissance de la biomasse, fournissant des informations précieuses pour l'optimisation des bioprocédés impliquant *Trichoderma virens* FEC 118. Ce travail a fait l'objet du rapport du stage M1 d'Arazazu Merodio.

### **Impact des limitations nutritionnelles sur la cinétique de croissance et la sporulation de *Trichoderma virens* dans des milieux synthétiques et semi-synthétiques**

Cette étude préliminaire, dans le cadre du projet M2 d'Alick COSTA, se focalise sur la culture et la biocinétique de *Trichoderma virens* FEC 118 en cultures submergées utilisant des milieux synthétiques et semi-synthétiques. L'objectif était de comprendre la cinétique de croissance, les conditions de sporulation et les taux de consommation de substrat dans ces milieux. *Trichoderma virens* est un champignon filamenteux présentant un potentiel significatif dans les applications biotechnologiques en raison de sa capacité à produire des enzymes et des métabolites secondaires essentiels à la dégradation de la biomasse lignocellulosique et au contrôle des pathogènes végétaux. Une revue exhaustive de la littérature a été réalisée sur les limitations des méthodes traditionnelles de fermentation en état solide (SSF), souvent laborieuses et difficiles à mettre à l'échelle. La fermentation liquide submergée (SLF) a été proposée comme une alternative plus efficace. Des méthodologies expérimentales ont également été développées/affinées pour surveiller la cinétique de croissance et quantifier la production de biomasse et de spores. L'étude a employé des stratégies d'échantillonnage à haute fréquence et échelonnées pour capturer avec précision les changements dynamiques de la croissance fongique et de la biocinétique. Les résultats indiquent que les milieux semi-synthétiques (SSM) ont favorisé des taux de croissance plus élevés ( $\mu = 0,167 \text{ h}^{-1}$ ) par rapport aux milieux synthétiques (SM) ( $\mu = 0,107 \text{ h}^{-1}$ ), probablement en raison de la présence de nutriments supplémentaires tels que l'extrait de levure et le tryptone, qui offrent un environnement plus riche pour la division cellulaire et l'accumulation de biomasse. Ce taux de croissance amélioré dans les SSM était associé à un rendement en biomasse plus élevé, avec un taux spécifique de consommation de substrat de  $-0,39 \text{ g} \cdot \text{g}_{CDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . En revanche, dans les SM, le taux spécifique de consommation de substrat était plus élevé à  $-0,50 \text{ g} \cdot \text{g}_{CDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , entraînant une déplétion plus rapide des nutriments, principalement du glucose. Cette utilisation rapide du substrat dans les SM ne s'est pas traduite par une croissance plus rapide, mais a plutôt déclenché un début de sporulation plus précoce (limitation nutritionnelle). La recherche souligne l'importance de la composition nutritionnelle dans l'influence de la croissance fongique et de la sporulation, les milieux semi-synthétiques étant plus adaptés à une production rapide de biomasse. En revanche, les milieux synthétiques favorisent la production de spores dans des conditions de limitation nutritionnelle. D'autres travaux seront réalisés pour explorer différents rapports C et pour étudier l'impact des facteurs environnementaux tels que le pH, la température et les niveaux d'oxygène sur la croissance fongique, ainsi que des modèles plus avancés pour mieux comprendre la biocinétique dans des conditions changeantes.

### **Perspectives - travaux en cours**

Ces résultats sur *T.virens* ont permis de mettre en lumière les effets du substrats sur la croissance, la sporulation et la morphologie à différent stade physiologique. Ce travail préliminaire permet d'approfondir cette étude en déployant les axes de travail énoncés en section précédente sur les approches *single-cell* en microfluidique. Une première approche consiste à manipuler des spores dans des canaux parallèles, avec un milieu nutritif synthétique continu et suivre en temps réel la germination puis la croissance. Cette croissance sera suivie en temps réel par analyse d'images pour quantifier le taux d'élongation.

Plusieurs paramètres seront ensuite déclinés par degré de complexité en modulant les aspects nutritionnel (ratio C/N), le pH, et la  $pO_2$  déjà décrit en section précédente avec *Yarrowia lipolytica*.

En conclusion, le projet Phy4FUN est une première brique à l'édifice que je suis en train

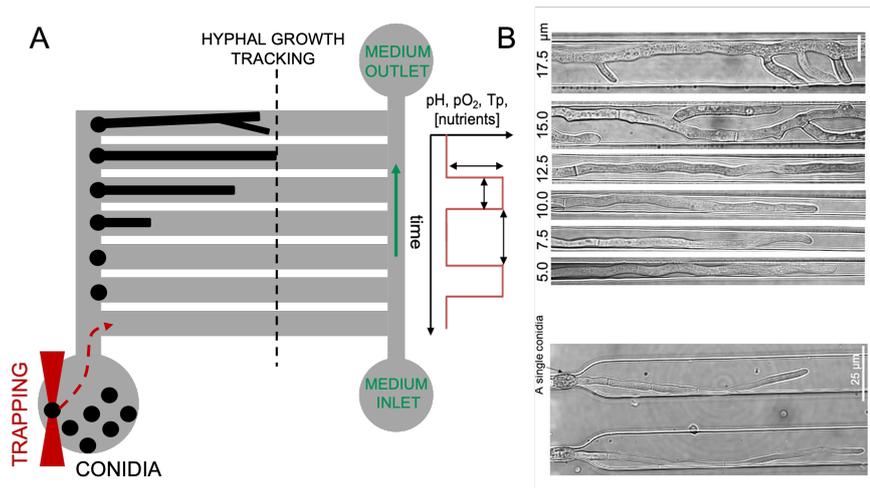


FIGURE 3.10 – **A.** Exemple de dispositif microfluidique permettant le positionnement de spores (codinias) individuels à l’entrée d’un canal au moyen de la pince optique et suivi de la germination puis de la croissance (élongation) de formes hyphales (mycélium) en fonction du temps et du gradient en pH/ $pO_2$  et/ou Température ( $T_p$ ), qu’il soit constant ou fluctuant (courbe en créneau). **B.** Suivi de mycelia de *Trichoderma reesei*, en condition de gradient de glucose pour suivre la production de sécrétome (extrait de Ref.[187])

de bâtir. Ce projet ouvre la voie vers la compréhension du comportement des souches, ici des champignons filamenteux, face aux contraintes d’hétérogénéité du bioréacteur en s’appropriant la problématique par l’angle de réduction d’échelle en général. Plus spécifiquement, les champignons filamenteux révèlent une formidable complexité morphologique donc l’activité enzymatique et leur plus-value reste encore à explorer.

# Conclusion

"Lorsque tu ne sais pas où tu vas,  
regarde d'où tu viens."

---

Proverbe africain

C'est sur ce proverbe que je souhaitai terminer ce manuscrit. En effet, ce document marque la présentation de mon dossier au diplôme d'Habilitation à Diriger les Recherches (HDR) dont la rédaction a débuté en juillet 2023, en dilettante au début, avec un sentiment de contrainte en arrière-plan et une vision assez floue du projet scientifique d'un manuscrit HDR.

Depuis la soutenance de thèse, un 8 novembre 2007, j'ai suivi un parcours plutôt cohérent autour de l'adhésion microbienne sur des surfaces ou interactions entre microorganismes, avec un goût prononcé pour le développement d'outils et de méthodes physiques, notamment la pince optique. J'ai malheureusement pas pu résister à la présentation de cette technique et ses subtilités dans la calibration en préambule du Chapitre 2, car effectivement c'est bien de là que je viens. Présenter ses activités scientifiques ne peut pas se découpler des nombreuses heures de développements techniques. C'est finalement lors mon accession au poste de Chargé de Recherche à l'INRA, que la chef de Département me mit en garde "Tu ne seras pas M. Pince Optique!" et c'est pourquoi j'ai orienté mes recherches autour d'une question scientifique plutôt que d'un outil, aussi performant soit-il. J'ai en effet intégré l'INRA en 2010 sur des questions centrées sur les interactions du microbiote avec le mucus intestinal en déployant des méthodes et outils biophysiques de type *Matière Molle* pour répondre à ce types de questions. Ce sont ces mêmes outils qui répondent encore aujourd'hui aux questions scientifiques que j'aborde.

J'ai pu profiter de cet exercice rétrospectif - regarder d'où je venais - pour voir ce que j'avais réalisé et quelle direction je souhaitais prendre. J'aurai pu continuer mes activités autour de l'adhésion microbienne, du film de contamination/conditionnement au biofilm structuré, mais j'ai souhaité amorcer une nouvelle trajectoire en cohérence avec les préoccupations de mon Institut, de mon unité et de mon équipe dont j'ai la direction depuis 2020. C'est pourquoi je reste assez évasif sur la partie 3.2 et plus complet en partie 3.3 même si je ne maîtrise pas tous les aspects (modélisation métabolique et bilan de population par exemple). Ce document, et la présentation qui suivra, évalueront ma capacité à concevoir, diriger, animer et coordonner des activités de recherche et de valorisation. Nul doute que ma créativité, comme celle de mes nombreux collègues chercheurs, sera bien accueillie, et il est certain que ce projet scientifique demandera encore du temps pour mûrir, même si les premières actions citées sont déjà amorcées et très prometteuses.



# Bibliographie

1. THOMAS, P. Le guano et les oiseaux des îles Ballestas, Pérou : les conséquences d'un upwelling. *Planet Terre*. ISSN : ISSN 2552-9250 (déc. 2019).
2. PIAU, J. -. & DEBIANE, K. Consistometers rheometry of power-law viscous fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* **127**, 213-224. ISSN : 0377-0257 (mai 2005).
3. BAGES, A., CASTELAIN, M., DIETRICH, N., RAYNAL, R. & IOUALALEN, K. Hydrophobic solid lipid-based microparticles for the protection of gastric-sensitive hydrophilic active biomolecules for oral administration in the treatment of EPI. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **204**, 114504. ISSN : 0939-6411 (nov. 2024).
4. STOODLEY, P., DEBEER, D. & LEWANDOWSKI, Z. Liquid Flow in Biofilm Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2711-2716. ISSN : 0099-2240 (août 1994).
5. SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. eng. *Trends in Microbiology* **9**, 222-227. ISSN : 0966-842X (mai 2001).
6. WATNICK, P. & KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* **182**. Publisher: American Society for Microbiology, 2675-2679 (mai 2000).
7. ASHKIN, A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letters* **24**, 156-159 (1970).
8. ASHKIN, A. Micromanipulation of single living cells using infra red laser traps. *Cytometry* **0**, 17 (1990).
9. NEUMAN, K. C. & BLOCK, S. M. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments* **75**, 2787-2809 (2004).
10. VISSCHER, K., GROSS, S. P. & BLOCK, S. M. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE Journal Of Selected Topics In Quantum Electronics* **2**, 1066-1076. ISSN : 1077-260X (1996).
11. OTTO, O. *et al.* High-speed video-based tracking of optically trapped colloids. *Journal of Optics* **13**, 044011. ISSN : 2040-8978, 2040-8986 (avr. 2011).
12. SVOBODA, K. & BLOCK, S. M. Biological applications of optical forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**, 247-285. ISSN : 1056-8700 (1994).
13. GITTES, F. & SCHMIDT, C. F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters* **23**, 7-9 (1998).
14. ROHRBACH, A. & STELZER, E. H. K. Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles. *Journal of Applied Physics* **91**, 5474-5488 (avr. 2002).
15. LANG, M. J., ASBURY, C. L., SHAEVITZ, J. W. & BLOCK, S. M. An Automated Two-Dimensional Optical Force Clamp for Single Molecule Studies. *Biophysical Journal* **83**, 491-501 (juill. 2002).
16. CASTELAIN, M., ROUXHET, P. G., PIGNON, F., MAGNIN, A. & PIAU, J. M. Single-cell adhesion probed in-situ using optical tweezers: A case study with *Saccharomyces cerevisiae*. English. *Journal of Applied Physics* **111**. ISSN : 0021-8979 (juin 2012).

17. RIEF, F. *Fundamentals of statistical and thermal physics* (McGraw-Hill, New York, 1965).
18. GITTES, F. & SCHMIDT, G. F. Signals and noise in micromechanical measurements. *Methods in Cell Biology* **55**, 129-156 (1998).
19. KOJIC, E. M. & DAROUICHE, R. O. Candida infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 255-+ (avr. 2004).
20. WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* **39**, 1093-1093 (oct. 2004).
21. MERCIER-BONIN, M., OUAZZANI, K., SCHMITZ, P. & LORTHOIS, S. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. eng. *J Colloid Interface Sci* **271**, 342-50. ISSN : 0021-9797 (Print) 0021-9797 (Linking) (mars 2004).
22. GUILLEMOT, G., LORTHOIS, S., SCHMITZ, P. & MERCIER-BONIN, M. Evaluating the adhesion force between *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and polystyrene from shear-flow induced detachment experiments. English. *Chemical Engineering Research & Design* **85**, 800-807. ISSN : 0263-8762 (juin 2007).
23. GUILLEMOT, G. *et al.* Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties. eng. *Colloids Surf B* **49**, 126-35. ISSN : 0927-7765 (Print) 0927-7765 (Linking) (mai 2006).
24. CASTELAIN, M., PIGNON, F., PIAU, J. M. & MAGNIN, A. The initial single yeast cell adhesion on glass via optical trapping and Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek predictions. *Journal of Chemical Physics* **128** (avr. 2008).
25. CASTELAIN, M. *et al.* Removal forces and adhesion properties of *Saccharomyces cerevisiae* on glass substrates probed by optical tweezer. *Journal of Chemical Physics* **127** (oct. 2007).
26. CASTELAIN, M., PIGNON, F., PIAU, J.-M. & MAGNIN, A. Propriétés d'adhésion de levures sur le verre, sondées par pince optique. Influence de paramètres environnementaux. fr. *Rhéologie* **12** (2007).
27. DERJAGUIN, B. & LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science* **43**, 30-59. ISSN : 0079-6816 (mai 1993).
28. VERWEY, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* **51**. Publisher: American Chemical Society, 631-636. ISSN : 0092-7023 (mars 1947).
29. ABERG, V. & ALMQVIST, F. Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence. eng. *Org Biomol Chem* **5**, 1827-34. ISSN : 1477-0520 (Print) 1477-0520 (Linking) (juin 2007).
30. ANDERSSON, M., FÄLLMAN, E., UHLIN, B. E. & AXNER, O. Dynamic force spectroscopy of the unfolding of P pili. *Biophysical Journal* **91**, 2717-2725 (2006).
31. ANDERSSON, M., FALLMAN, E., UHLIN, B. E. & AXNER, O. A sticky chain model of the elongation and unfolding of *Escherichia coli* P pili under stress. eng. *Biophys J* **90**, 1521-34. ISSN : 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking) (mars 2006).
32. ANDERSSON, M., FÄLLMAN, E., UHLIN, B. E. & AXNER, O. Force measuring optical tweezers system for long time measurements of pili stability. *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers* **6088**, 286-295 (2006).
33. MU, X. Q. & BULLITT, E. Structure and assembly of P-pili: A protruding hinge region used for assembly of a bacterial adhesion filament. *Proceedings of the National Academy of Science in USA* **103**, 9861-9866 (juin 2006).

34. SJÖSTRÖM, A. E. *et al.* The SfaX<sub>II</sub> protein from newborn meningitis *E. coli* is involved in regulation of motility and type 1 fimbriae expression. *Microbial pathogenesis In Press*, doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.007. ISSN : 0882-4010 (2009).
35. CASTELAIN, M., SJOSTROM, A. E., FALLMAN, E., UHLIN, B. E. & ANDERSSON, M. Unfolding and refolding properties of S pili on extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. eng. *Eur Biophys J* **39**, 1105-15. ISSN : 1432-1017 (Electronic) 0175-7571 (Linking) (juill. 2010).
36. BAROCCHI, M. A. *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2857-2862 (fév. 2006).
37. IOVINO, F., NANNAPANENI, P., HENRIQUES-NORMARK, B. & NORMARK, S. The impact of the ancillary pilus-1 protein RrgA of *Streptococcus pneumoniae* on colonization and disease. eng. *Molecular Microbiology* **113**, 650-658. ISSN : 1365-2958 (mars 2020).
38. MUFIDA, D. C., PERWITASARI, R., AGUSTINA, D., SHODIKIN, M. A. & SUSWATI, E. Characterization of Pili Protein 67 kDa *Streptococcus pneumoniae*: New Candidate for Virulence Factor-Based Pneumococcal Antigen Vaccine. eng. *Protein and Peptide Letters* **29**, 702-710. ISSN : 1875-5305 (2022).
39. HILLERINGMANN, M. *et al.* Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 pili. *EMBO J.* **28**, 3921-3930 (déc. 2009).
40. BUSTAMANTE, C., MARKO, J. F., SIGGIA, E. D. & SMITH, S. Entropic Elasticity of Lambda-Phage DNA. *Science* **265**, 1599-1600 (sept. 1994).
41. MARKO, J. F. & SIGGIA, E. D. Stretching DNA. *Macromol* **28**, 8759-8770 (déc. 1995).
42. ALEGRE-CEBOLLADA, J., BADILLA, C. L. & FERNANDEZ, J. M. Isopeptide bonds block the mechanical extension of pili in pathogenic *Streptococcus pyogenes*. eng. *J Biol Chem* **285**, 11235-42. ISSN : 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking) (avr. 2010).
43. SHENG, Y. H. & HASNAIN, S. Z. Mucus and Mucins: The Underappreciated Host Defence System. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**, 856962. ISSN : 2235-2988 (juin 2022).
44. BERGSTROM, K. S. B. *et al.* Muc2 Protects against Lethal Infectious Colitis by Disassociating Pathogenic and Commensal Bacteria from the Colonic Mucosa. en. *PLoS Pathogens* **6**. Publisher: Public Library of Science, e1000902. ISSN : 1553-7374 (2010).
45. JOHANSSON, M. E. V. *et al.* Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. en. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 3635-3641. ISSN : 1420-682X, 1420-9071 (nov. 2011).
46. CRATER, J. S. & CARRIER, R. L. Barrier Properties of Gastrointestinal Mucus to Nanoparticle Transport: Barrier Properties of Gastrointestinal Mucus to Nanoparticle ... en. *Macromolecular Bioscience* **10**, 1473-1483. ISSN : 16165187 (déc. 2010).
47. LAVELLE, E. C. & WARD, R. W. Mucosal vaccines — fortifying the frontiers. en. *Nature Reviews Immunology* **22**. Number: 4 Publisher: Nature Publishing Group, 236-250. ISSN : 1474-1741 (avr. 2022).
48. LE, D.-T.-L. *Identification et caractérisation des déterminants physico-chimiques et biologiques mis en jeu dans l'adhésion de Lactococcus lactis à la mucine modèle PGM* These de doctorat (Toulouse, INSA, oct. 2011).
49. TRAN, T.-L. *Unraveling the muco-adhesion of Lactococcus lactis : development of biophysical approaches* These de doctorat (Toulouse, INSA, déc. 2013).
50. LE, D. T. *et al.* Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PLoS One* **8**, e79850. ISSN : 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking) (2013).

51. GITTES, F., SCHNURR, B., OLMSTED, P. D., MACKINTOSH, F. C. & SCHMIDT, C. F. Microscopic viscoelasticity: Shear moduli of soft materials determined from thermal fluctuations. English. *Physical Review Letters* **79**, 3286-3289. ISSN : 0031-9007 (oct. 1997).
52. MASON, T. G. Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes-Einstein equation. English. *Rheologica Acta* **39**, 371-378. ISSN : 0035-4511 (août 2000).
53. CROCKER, J. C. *et al.* Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. English. *Physical Review Letters* **85**, 888-891. ISSN : 0031-9007 (juill. 2000).
54. PASSERINI, D. *et al.* Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS One* **5**, e15306. ISSN : 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking) (2010).
55. OXARAN, V. *et al.* Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS One* **7**, e50989. ISSN : 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking) (2012).
56. CASTELAIN, M. *et al.* The Nanomechanical Properties of *Lactococcus lactis* Pili Are Conditioned by the Polymerized Backbone Pilin. *PLOS ONE* **11**, e0152053. ISSN : 1932-6203 (mars 2016).
57. CASTELAIN, M. *et al.* Oligomerized backbone pilin helps piliated *Lactococcus lactis* to withstand shear flow. *Biofouling* **32**, 911-23. ISSN : 1029-2454 (Electronic) 0892-7014 (Linking) (sept. 2016).
58. DRAMÉ, I. *Etude du rôle des pili de Lactococcus lactis dans la structuration d'un biofilm : approche biophysique multi-échelle* These de doctorat (Toulouse, INSA, mars 2021).
59. DRAMÉ, I. *et al.* Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using Single-Cell Force Spectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **12**. Publisher: American Chemical Society, 21411-21423. ISSN : 1944-8244 (mai 2020).
60. TRIPATHI, P. *et al.* Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano* **7**, 3685-97. ISSN : 1936-086X (Electronic) 1936-0851 (Linking) (avr. 2013).
61. DRAMÉ, I. *et al.* Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms. eng. *Scientific Reports* **11**, 4846. ISSN : 2045-2322 (mars 2021).
62. GLOAG, E. S., WOZNIAK, D. J., STOODLEY, P. & HALL-STOODLEY, L. Mycobacterium abscessus biofilms have viscoelastic properties which may contribute to their recalcitrance in chronic pulmonary infections. eng. *Scientific Reports* **11**, 5020. ISSN : 2045-2322 (mars 2021).
63. STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z., BOYLE, J. D. & LAPPIN-SCOTT, H. M. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **65**, 83-92. ISSN : 0006-3592 (oct. 1999).
64. KLAPPER, I., RUPP, C. J., CARGO, R., PURVEDORJ, B. & STOODLEY, P. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **80**, 289-296. ISSN : 0006-3592 (nov. 2002).
65. WANG, H. *et al.* Influence of Fimbriae on Bacterial Adhesion and Viscoelasticity and Correlations of the Two Properties with Biofilm Formation. en. *Langmuir* **33**, 100-106. ISSN : 0743-7463, 1520-5827 (jan. 2017).
66. BRANDA, S. S., CHU, F., KEARNS, D. B., LOSICK, R. & KOLTER, R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. en. *Molecular Microbiology* **59**, 1229-1238. ISSN : 1365-2958 (2006).

67. KARIMI, A., KARIG, D., KUMAR, A. & ARDEKANI, A. M. Interplay of Physical Mechanisms and Biofilm Processes: Review of Microfluidic Methods. *Lab on a chip* **15**, 23-42. ISSN : 1473-0197 (jan. 2015).
68. COMPÈRE, C. *et al.* Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling* **17**, 129-145. ISSN : 0892-7014 (juill. 2001).
69. LOEB, G. I. & NEIHOF, R. A. in *Applied Chemistry at Protein Interfaces Advances in Chemistry* 145. Section: 16, 319-335 (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, juin 1975). ISBN : 978-0-8412-0215-3.
70. FLETCHER, M. Bacterial biofilms and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology* **5**, 302-306. ISSN : 0958-1669 (juin 1994).
71. RUBIO, C. *Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention* fr. Thèse de doct. (Université Paris 6, juill. 2002).
72. LEROY, C. *Lutte contre les salissures marines: approche par procédés enzymatiques.* thèse de doct. (Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 2006).
73. NAN, Z. *Pour la lutte contre les biosalissures : exploration de nouvelles surfaces anti-adhésives et bioactives* juin 2021.
74. TENDERO, C. *et al.* Nanocomposite thin film of Ag nanoparticles embedded in amorphous Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on optical sensors windows: Synthesis, characterization and targeted application towards transparency and anti-biofouling. *Surface and Coatings Technology* **328**, 371-377. ISSN : 0257-8972 (nov. 2017).
75. YI, P. *et al.* Anti-biofouling properties of TiO<sub>2</sub> coating with coupled effect of photocatalysis and microstructure. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **656**, 130357. ISSN : 0927-7757 (jan. 2023).
76. NAN, Z., FLOQUET, P., COMBES, D., TENDERO, C. & CASTELAIN, M. Surface Conditioning Effects on Submerged Optical Sensors: A Comparative Study of Fused Silica, Titanium Dioxide, Aluminum Oxide, and Parylene C. eng. *Sensors (Basel, Switzerland)* **23**, 9546. ISSN : 1424-8220 (nov. 2023).
77. HÖLKEN, I. *et al.* Complex shaped ZnO nano- and microstructure based polymer composites: mechanically stable and environmentally friendly coatings for potential anti-fouling applications. en. *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 7114-7123. ISSN : 1463-9084 (mars 2016).
78. QIU, H. *et al.* Development and Characterization of Mechanically Durable Silicone-Polythiourethane Composites Modified with Tetrapodal Shaped ZnO Particles for the Potential Application as Fouling-Release Coating in the Marine Sector. en. *Materials* **11**, 2413 (déc. 2018).
79. KLEMM, S. *et al.* Development of Polythiourethane/ZnO-Based Anti-Fouling Materials and Evaluation of the Adhesion of Staphylococcus aureus and Candida glabrata Using Single-Cell Force Spectroscopy. en. *Nanomaterials* **11**. Number: 2 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 271 (fév. 2021).
80. VALENCIA NAVARRO, A. J. *Micro-scale study of the first stage of cake formation for the microfiltration of model particle and yeast suspensions : In-situ and real-time experimental approach* These de doctorat (Toulouse, INPT, jan. 2020).
81. RAHBANI, J. *Optimisation, étude de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides à base de souches de Bacillus thuringiensis isolées du sol Libanais* fr. Thèse de doct. (Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT ; Université Saint-Joseph (Beyrouth), fév. 2015).

82. SILVA, M. C., SIQUEIRA, H. A. A., SILVA, L. M., MARQUES, E. J. & BARROS, R. Cry Proteins from *Bacillus thuringiensis* Active against Diamondback Moth and Fall Armyworm. en. *Neotropical Entomology* **44**, 392-401. ISSN : 1519-566X, 1678-8052 (août 2015).
83. FAYAD, N. *et al.* Complete genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strains isolated from Lebanon and Tunisia, highly toxic against lepidopteran larvae. en. *Microbiology Resource Announcements* **12** (éd. THRASH, J. C.) e00060-23. ISSN : 2576-098X (sept. 2023).
84. MONROY, T. S. *et al.* Dynamic Model for Biomass and Proteins Production by Three *Bacillus Thuringiensis* ssp *Kurstaki* Strains. en. *Processes* **9**. Number: 12 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2147. ISSN : 2227-9717 (déc. 2021).
85. FENIBO, E. O., IJOMA, G. N. & MATAMBO, T. Biopesticides in Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed by Green Chemistry Principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **5**, 619058. ISSN : 2571-581X (juin 2021).
86. FAYAD, N., KALLASSY AWAD, M. & MAHILLON, J. Diversity of *Bacillus cereus* sensu lato mobilome. en. *BMC Genomics* **20**, 436. ISSN : 1471-2164 (déc. 2019).
87. GOMBERT, A. K. & NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. eng. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 180-186. ISSN : 0958-1669 (avr. 2000).
88. ENFORS, S. O. *et al.* Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. eng. *Journal of Biotechnology* **85**, 175-185. ISSN : 0168-1656 (fév. 2001).
89. LARA, A. R., GALINDO, E., RAMÍREZ, O. T. & PALOMARES, L. A. Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. eng. *Molecular Biotechnology* **34**, 355-381. ISSN : 1073-6085 (nov. 2006).
90. BETTS, J. I. & BAGANZ, F. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories* **5**, 21. ISSN : 1475-2859 (mai 2006).
91. GRUENBERGER, A. *et al.* Microfluidic Picoliter Bioreactor for Microbial Single-cell Analysis: Fabrication, System Setup, and Operation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 50560. ISSN : 1940-087X (déc. 2013).
92. DARVISHI, F., FATHI, Z., ARIANA, M. & MORADI, H. *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. en. *Biochemical Engineering Journal* **127**, 87-96. ISSN : 1369-703X (nov. 2017).
93. COLLIGNON, M. L., DOSSIN, D., DELAFOSSE, A. & CRINE, M. Quality of mixing in a stirred bioreactor used for animal cells culture: heterogeneities in a lab scale bioreactor and evolution of mixing time with scale up.
94. DELVIGNE, F. & GOFFIN, P. Microbial heterogeneity affects bioprocess robustness: Dynamic single-cell analysis contributes to understanding of microbial populations. en. *Biotechnology Journal* **9**, 61-72. ISSN : 1860-7314 (2014).
95. LEJEUNE, A., FRANK, D. & THONART, P. Physiological response of yeast to process perturbations: A mini-bioreactor approach. en. *Cerevisia* **38**, 15-19. ISSN : 1373-7163 (avr. 2013).
96. REUSS, M., SCHMALZRIEDT, S. & JENNE, M. en. in *Advances in Bioprocess Engineering* (éd. GALINDO, E. & RAMÍREZ, O. T.) 207-215 (Springer Netherlands, Dordrecht, 1994). ISBN : 978-94-017-0641-4.
97. RIVERA, D., MARGARITIS, A. & de LASA, H. A sporulation kinetic model for batch growth of *B. thuringiensis*. en. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **77**.  
\_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cjce.5450770516>, 903-910. ISSN : 1939-019X (1999).

98. DELAFOSSE, A. *et al.* CFD-based compartment model for description of mixing in bioreactors. *Chemical Engineering Science* **106**, 76-85. ISSN : 0009-2509 (mars 2014).
99. DELAFOSSE, A. *et al.* Euler–Lagrange approach to model heterogeneities in stirred tank bioreactors – Comparison to experimental flow characterization and particle tracking. *Chemical Engineering Science* **134**, 457-466. ISSN : 0009-2509 (sept. 2015).
100. NIELSEN, J. & VILLADSEN, J. Modelling of microbial kinetics. en. *Chemical Engineering Science* **47**, 4225-4270. ISSN : 0009-2509 (déc. 1992).
101. FINK, M., CSERJAN-PUSCHMANN, M., REINISCH, D. & STRIEDNER, G. High-throughput microbioreactor provides a capable tool for early stage bioprocess development. en. *Scientific Reports* **11**, 2056. ISSN : 2045-2322 (jan. 2021).
102. ERIKSSON, E. *et al.* Optical manipulation and microfluidics for studies of single cell dynamics. en. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **9**. Publisher: IOP Publishing, S113-S121. ISSN : 1464-4258 (juill. 2007).
103. SUBRAMANIAN, G., RAMKRISHNA, D., FREDRICKSON, A. G. & TSUCHIYA, H. M. On the mass distribution model for microbial cell populations. en. *The Bulletin of Mathematical Biophysics* **32**, 521-537. ISSN : 0007-4985, 1522-9602 (déc. 1970).
104. HEINS, A.-L., LENCASTRE FERNANDES, R., GERNAEY, K. V. & LANTZ, A. E. Experimental and in silico investigation of population heterogeneity in continuous *Saccharomyces cerevisiae* scale-down fermentation in a two-compartment setup. en. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **90**, 324-340. ISSN : 1097-4660 (2015).
105. YOUNG, J. D., HENNE, K. L., MORGAN, J. A., KONOPKA, A. E. & RAMKRISHNA, D. Integrating cybernetic modeling with pathway analysis provides a dynamic, systems-level description of metabolic control. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **100**, 542-559. ISSN : 1097-0290 (juin 2008).
106. STAMATAKIS, M. & ZYGOURAKIS, K. A mathematical and computational approach for integrating the major sources of cell population heterogeneity. eng. *Journal of Theoretical Biology* **266**, 41-61. ISSN : 1095-8541 (sept. 2010).
107. FERNANDES, R. L. *et al.* Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity. eng. *Biotechnology Advances* **29**, 575-599. ISSN : 1873-1899 (2011).
108. MALUTA, F., PIGOU, M., MONTANTE, G. & MORCHAIN, J. Modeling the effects of substrate fluctuations on the maintenance rate in bioreactors with a probabilistic approach. *Biochemical Engineering Journal* **157**, 107536. ISSN : 1369-703X (avr. 2020).
109. HARINGA, C. *et al.* Euler-Lagrange computational fluid dynamics for (bio)reactor scale down: An analysis of organism lifelines. eng. *Engineering in Life Sciences* **16**, 652-663. ISSN : 1618-0240 (oct. 2016).
110. MORCHAIN, J., GABELLE, J.-C. & COCKX, A. A coupled population balance model and CFD approach for the simulation of mixing issues in lab-scale and industrial bioreactors. en. *AIChE Journal* **60**, 27-40. ISSN : 1547-5905 (2014).
111. PIGOU, M., MORCHAIN, J., FEDE, P., PENET, M.-I. & LARONZE, G. An assessment of methods of moments for the simulation of population dynamics in large-scale bioreactors. *Chemical Engineering Science* **171**, 218-232. ISSN : 0009-2509 (nov. 2017).
112. PIGOU, M. *Modélisation du comportement cinétique, des phénomènes de mélange et de transfert locaux, et des effets d'hétérogénéité de population dans les fermenteurs industriels* These de doctorat (Toulouse, INSA, oct. 2018).
113. PIGOU, M. & MORCHAIN, J. Investigating the interactions between physical and biological heterogeneities in bioreactors using compartment, population balance and metabolic models. *Chemical Engineering Science* **126**, 267-282. ISSN : 0009-2509 (avr. 2015).

114. QUEDEVILLE, V. *et al.* A two-dimensional population balance model for cell growth including multiple uptake systems. *Chemical Engineering Research and Design* **132**, 966-981. ISSN : 0263-8762 (avr. 2018).
115. MORCHAIN, J., QUEDEVILLE, V., FOX, R. O. & VILLEDIEU, P. The closure issue related to liquid-cell mass transfer and substrate uptake dynamics in biological systems. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **118**, 2435-2447. ISSN : 1097-0290 (juill. 2021).
116. MORCHAIN, J., PIGOU, M. & LEBAZ, N. A population balance model for bioreactors combining interdivision time distributions and micromixing concepts. *Biochemical Engineering Journal* **126**. Publisher: Elsevier, 135-145 (2017).
117. QUEDEVILLE, V. *Mathematical analysis, modelling and simulation of microbial population dynamics* These de doctorat (Toulouse, INPT, juin 2020).
118. MILLARD, P., MASSOU, S., WITTMANN, C., PORTAIS, J.-C. & LÉTISSE, F. Sampling of intracellular metabolites for stationary and non-stationary (<sup>13</sup>C) metabolic flux analysis in *Escherichia coli*. eng. *Analytical Biochemistry* **465**, 38-49. ISSN : 1096-0309 (nov. 2014).
119. LEMOINE, A., MAYA MARTNEZ-ITURRALDE, N., SPANN, R., NEUBAUER, P. & JUNNE, S. Response of *Corynebacterium glutamicum* exposed to oscillating cultivation conditions in a two- and a novel three-compartment scale-down bioreactor. en. *Biotechnology and Bioengineering* **112**, 1220-1231. ISSN : 1097-0290 (2015).
120. MARBÀ-ARDÉBOL, A.-M., EMMERICH, J., MUTHIG, M., NEUBAUER, P. & JUNNE, S. Real-time monitoring of the budding index in *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivations with in situ microscopy. eng. *Microbial Cell Factories* **17**, 73. ISSN : 1475-2859 (mai 2018).
121. GUILLOU, V., PLOURDE-OWOBI, L., PARROU, J. L., GOMA, G. & FRANÇOIS, J. Role of reserve carbohydrates in the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae*. eng. *FEMS yeast research* **4**, 773-787. ISSN : 1567-1356 (sept. 2004).
122. HATTORI, M., HORIGOME, C., ASPERT, T., CHARVIN, G. & KOBAYASHI, T. Changed life course upon defective replication of ribosomal RNA genes. eng. *Genes & Genetic Systems*. ISSN : 1880-5779 (mars 2023).
123. PETELENZ-KURDZIEL, E. *et al.* Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. en. *Integrative Biology* **3**. Publisher: The Royal Society of Chemistry, 1120-1126. ISSN : 1757-9708 (oct. 2011).
124. CONVERY, N. & GADEGAARD, N. 30 years of microfluidics. en. *Micro and Nano Engineering* **2**, 76-91. ISSN : 2590-0072 (mars 2019).
125. KAMHOLZ, A. E., WEIGL, B. H., FINLAYSON, B. A. & YAGER, P. Quantitative Analysis of Molecular Interaction in a Microfluidic Channel: The T-Sensor. *Analytical Chemistry* **71**. Publisher: American Chemical Society, 5340-5347. ISSN : 0003-2700 (déc. 1999).
126. WHEELER, A. R. *et al.* Microfluidic Device for Single-Cell Analysis. *Analytical Chemistry* **75**. Publisher: American Chemical Society, 3581-3586. ISSN : 0003-2700 (juill. 2003).
127. TAKAYAMA, S. *et al.* Subcellular positioning of small molecules. en. *Nature* **411**. Number: 6841 Publisher: Nature Publishing Group, 1016-1016. ISSN : 1476-4687 (juin 2001).
128. ASPERT, T. *Deciphering the aging dynamics using microfluidics and deep-learning* These de doctorat (Strasbourg, déc. 2021).
129. GORDON, V. D. & WANG, L. Bacterial mechanosensing: the force will be with you, always. *Journal of Cell Science* **132**, jcs227694. ISSN : 0021-9533 (avr. 2019).
130. CURTIS, J. E., KOSS, B. A. & GRIER, D. G. Dynamic holographic optical tweezers. *Optics Communications* **207**, 169-175. ISSN : 0030-4018 (juin 2002).

131. BEOPOULOS, A. *et al.* Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production. eng. *Progress in Lipid Research* **48**, 375-387. ISSN : 1873-2194 (nov. 2009).
132. BASTIDAS, R. J. & HEITMAN, J. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 351-352. ISSN : 0027-8424 (jan. 2009).
133. FILLAUDEAU, L. *et al.* Characterization of mycelial transition of Yarrowia lipolytica during oxidative cultures: comparison of optical methods and their limitation, impact of morphology on rheological behavior. en, 3 (2017).
134. POMRANING, K. R. *et al.* Regulation of Yeast-to-Hyphae Transition in Yarrowia lipolytica. *mSphere* **3**, e00541-18. ISSN : 2379-5042 (déc. 2018).
135. SCHNEPF, E. *et al.* Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. eng. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* **62**, 775-806. ISSN : 1092-2172 (sept. 1998).
136. ROWE, G. E. & MARGARITIS, A. Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from Bacillus thuringiensis HD-1 kurstaki. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **86**, 377-388. ISSN : 0006-3592 (mai 2004).
137. JÉRÔME MORCHAIN. *Bioreactor modeling: interactions between hydrodynamics and biology / Jérôme Morchain.* eng. ISBN : 978-1-78548-116-1 (ISTE Press Ltd ; Elsevier Ltd, 2017).
138. VAUGHN, W. M. & WEBER, G. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. Dynamic probe of the microenvironment. en. *Biochemistry* **9**, 464-473. ISSN : 0006-2960, 1520-4995 (fév. 1970).
139. RÜTTINGER, S., SPILLE, C., HOFFMANN, M. & SCHLÜTER, M. Laser-Induced Fluorescence in Multiphase Systems. en. *ChemBioEng Reviews* **5**, 253-269. ISSN : 2196-9744 (2018).
140. HIBY, J. W., BRAUN, D. & EICKEL, K. H. Eine Fluoreszenzmethode zur Untersuchung des Stoffübergangs bei der Gasabsorption im Rieselfilm. de. *Chemie Ingenieur Technik* **39**, 297-301. ISSN : 1522-2640 (1967).
141. WOLFF, L. M., LIU, Z. C. & HANRATTY, T. J. *A Fluorescence Technique to Measure Concentration Gradients near an Interface* in (1991).
142. WOLFF, L. M. & HANRATTY, T. J. Instantaneous concentration profiles of oxygen accompanying absorption in a stratified flow. en. *Experiments in Fluids* **16**, 385-392. ISSN : 1432-1114 (mai 1994).
143. MÜNSTERER, T. & JÄHNE, B. LIF measurements of concentration profiles in the aqueous mass boundary layer: en. *Experiments in Fluids* **25**, 190-196. ISSN : 0723-4864, 1432-1114 (août 1998).
144. JIMENEZ, M., DIETRICH, N. & HEBRARD, G. A new method for measuring diffusion coefficient of gases in liquids by PLIF. *Modern Physics Letters B* **26**. ISSN : 0217-9849 (2012).
145. WOODROW, P. T. & DUKE, S. R. Laser-Induced Fluorescence Studies of Oxygen Transfer Across Unsheared Flat and Wavy AirWater Interfaces. en. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **40**, 1985-1995. ISSN : 0888-5885, 1520-5045 (avr. 2001).
146. WALKER, J. W. & PEIRSON, W. L. Measurement of gas transfer across wind-forced wavy air-water interfaces using laser-induced fluorescence. *Experiments in Fluids* **44**. Publisher: Springer ADS Bibcode: 2008ExFl...44..249W, 249-259. ISSN : 0723-4864 (fév. 2008).

147. ROUDET, M., BILLET, A.-M., CAZIN, S., RISSO, F. & ROIG, V. Experimental investigation of interfacial mass transfer mechanisms for a confined high-reynolds-number bubble rising in a thin gap. en. *AIChE Journal* **63**, 2394-2408. ISSN : 1547-5905 (2017).
148. FELIS, F. *et al.* *Experiments on reactive mass transfer around an oxygen bubble rising freely in a confined cell using colourimetric methods* in (Lisbon, Portugal, juill. 2018).
149. BUTLER, C., CID, E. & BILLET, A. -. Modelling of mass transfer in Taylor flow: Investigation with the PLIF-I technique. *Chemical Engineering Research and Design. 10th European Congress of Chemical Engineering* **115**, 292-302. ISSN : 0263-8762 (nov. 2016).
150. KASTENS, S., MEYER, C., HOFFMANN, M. & SCHLÜTER, M. en. in *Transport Processes at Fluidic Interfaces* (éd. BOTHE, D. & REUSKEN, A.) 609-637 (Springer International Publishing, Cham, 2017). ISBN : 978-3-319-56602-3.
151. BUTLER, C., LALANNE, B., SANDMANN, K., CID, E. & BILLET, A.-M. Mass transfer in Taylor flow: Transfer rate modelling from measurements at the slug and film scale. en. *International Journal of Multiphase Flow* **105**, 185-201. ISSN : 03019322 (août 2018).
152. BORK, O., SCHLUETER, M. & RAEBIGER, N. The Impact of Local Phenomena on Mass Transfer in Gas-Liquid Systems. en. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **83**, 658-666. ISSN : 0008-4034, 1939-019X (août 2005).
153. DANI, A., GUIRAUD, P. & COCKX, A. Local measurement of oxygen transfer around a single bubble by planar laser-induced fluorescence. en. *Chemical Engineering Science* **62**, 7245-7252. ISSN : 00092509 (déc. 2007).
154. KÜCK, U. D., SCHLÜTER, M. & RÄBIGER, N. Local Measurement of Mass Transfer Rate of a Single Bubble with and without a Chemical Reaction. en. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN* **45**, 708-712. ISSN : 0021-9592, 1881-1299 (2012).
155. SOMEYA, S., BANDO, S., SONG, Y., CHEN, B. & NISHIO, M. DeLIF measurement of pH distribution around dissolving CO<sub>2</sub> droplet in high pressure vessel. en. *International Journal of Heat and Mass Transfer* **48**, 2508-2515. ISSN : 00179310 (juin 2005).
156. FRANCOIS, J., DIETRICH, N., GUIRAUD, P. & COCKX, A. Direct measurement of mass transfer around a single bubble by micro-PLIFI. en. *Chemical Engineering Science* **66**, 3328-3338. ISSN : 00092509 (juill. 2011).
157. JIMENEZ, M., DIETRICH, N. & HÉBRARD, G. Mass transfer in the wake of non-spherical air bubbles quantified by quenching of fluorescence. en. *Chemical Engineering Science* **100**, 160-171. ISSN : 00092509 (août 2013).
158. DIETRICH, N. *et al.* Fast Measurements of the Gas-Liquid Diffusion Coefficient in the Gaussian Wake of a Spherical Bubble. en. *Chemical Engineering & Technology* **38**, 941-946. ISSN : 0930-7516, 1521-4125 (mai 2015).
159. XU, F., COCKX, A., HÉBRARD, G. & DIETRICH, N. Mass Transfer and Diffusion of a Single Bubble Rising in Polymer Solutions. en. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **57**, 15181-15194. ISSN : 0888-5885, 1520-5045 (nov. 2018).
160. HUANG, J. & SAITO, T. Discussion about the differences in mass transfer, bubble motion and surrounding liquid motion between a contaminated system and a clean system based on consideration of three-dimensional wake structure obtained from LIF visualization. en. *Chemical Engineering Science* **170**, 105-115. ISSN : 00092509 (oct. 2017).
161. STERN, O. & VOLMER, M. On the quenching-time of fluorescence. *Zeitschrift für Physik* **20** (1919).

162. IWUNZE, M. O., LAMBERT, M. & SILVERSMITH, E. F. Characterization of fluorescent surfactant aggregates by fluorimetric and viscosimetric techniques. en. *Monatshefte für Chemie* **128**, 585-592. ISSN : 0026-9247, 1434-4475 (1997).
163. KUANG, Y. & WALT, D. R. Detecting oxygen consumption in the proximity of *Saccharomyces cerevisiae* cells using self-assembled fluorescent nanosensors. en. *Biotechnology and Bioengineering* **96**, 318-325. ISSN : 1097-0290 (2007).
164. HAN, S., DELVIGNE, F., BROGNAUX, A., CHARBON, G. E. & SØRENSEN, S. J. Design of growth-dependent biosensors based on destabilized GFP for the detection of physiological behavior of *Escherichia coli* in heterogeneous bioreactors. eng. *Biotechnology Progress* **29**, 553-563. ISSN : 1520-6033 (avr. 2013).
165. JAZINI, M., CEKICI, G. & HERWIG, C. Quantifying the Effects of Frequency and Amplitude of Periodic Oxygen-Related Stress on Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris*. en. *Bioengineering* **1**. Number: 1 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 47-61. ISSN : 2306-5354 (mars 2014).
166. SUNYA, S., DELVIGNE, F., URIBELARREA, J.-L., MOLINA-JOUVE, C. & GORRET, N. Comparison of the transient responses of *Escherichia coli* to a glucose pulse of various intensities. eng. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**, 1021-1034. ISSN : 1432-0614 (août 2012).
167. TIMOUMI, A. *et al.* Influence of oxygen availability on the metabolism and morphology of *Yarrowia lipolytica*: insights into the impact of glucose levels on dimorphism. eng. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**, 7317-7333. ISSN : 1432-0614 (oct. 2017).
168. LANGHEINRICH, C. & NIENOW, A. W. Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: Alkali addition and pH excursions. en. *Biotechnology and Bioengineering* **66**, 171-179. ISSN : 1097-0290 (1999).
169. XING, Z., KENTY, B. M., LI, Z. J. & LEE, S. S. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **103**, 733-746. ISSN : 1097-0290 (juill. 2009).
170. CORTÉS, J. T., FLORES, N., BOLÍVAR, F., LARA, A. R. & RAMÍREZ, O. T. Physiological effects of pH gradients on *Escherichia coli* during plasmid DNA production. eng. *Biotechnology and Bioengineering* **113**, 598-611. ISSN : 1097-0290 (mars 2016).
171. VILLADSEN, J., NIELSEN, J. & LIDÉN, G. en. in *Bioreaction Engineering Principles* (éd. VILLADSEN, J., NIELSEN, J. & LIDÉN, G.) 1-561 (Springer US, Boston, MA, 2011). ISBN : 978-1-4419-9688-6.
172. TIMOUMI, A., GUILLOUET, S. E., MOLINA-JOUVE, C., FILLAUDEAU, L. & GORRET, N. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. eng. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 3831-3848. ISSN : 1432-0614 (mai 2018).
173. TIMOUMI, A. *et al.* Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. eng. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**, 351-366. ISSN : 1432-0614 (jan. 2017).
174. TIMOUMI, A. *Study of the dynamics of physiological and metabolic responses of Yarrowia lipolytica to environmental physico-chemical perturbations* en. Thèse de doct. (INSA de Toulouse, juin 2017).
175. SARRAFZADEH, M. H. *et al.* Growth, Sporulation, -Endotoxins Synthesis, and Toxicity During Culture of *Bacillus thuringiensis* H14. en. *Current Microbiology* **51**, 75-81. ISSN : 1432-0991 (août 2005).
176. JALLOULI, W., DRISS, F., FILLAUDEAU, L. & ROUIS, S. Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* since 1990: Focus on bioprocess parameters. en. *Process Biochemistry* **98**, 224-232. ISSN : 13595113 (nov. 2020).

177. EL KHOURY, M. *et al.* Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new cry1Aa gene highly toxic to *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. en. *Archives of Microbiology* **196**, 435-444. ISSN : 1432-072X (juin 2014).
178. ROBLES-RODRÍGUEZ, C. E. *et al.* Modeling and optimization of lipid accumulation by *Yarrowia lipolytica* from glucose under nitrogen depletion conditions. en. *Biotechnology and Bioengineering* **115**, 1137-1151. ISSN : 1097-0290 (2018).
179. HEREDIA, A., JIMENEZ, A. & GUILLON, R. Composition of plant cell walls. en. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **200**, 24-31. ISSN : 0044-3026, 1438-2385 (jan. 1995).
180. ISIKGOR, F. H. & BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. en. *Polymer Chemistry* **6**, 4497-4559. ISSN : 1759-9954, 1759-9962 (2015).
181. SETHI, S., DATTA, A., GUPTA, B. L. & GUPTA, S. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. en. *ISRN Biotechnology* **2013**, 1-7. ISSN : 2090-9403 (fév. 2013).
182. JANUSZ, G. *et al.* Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. en. *FEMS Microbiology Reviews* **41**, 941-962. ISSN : 1574-6976 (nov. 2017).
183. ANASONTZIS, G. E. *et al.* Rice straw hydrolysis using secretomes from novel fungal isolates from Vietnam. en. *Biomass and Bioenergy* **99**, 11-20. ISSN : 09619534 (avr. 2017).
184. BOUALEM, K., LABRIE, S., GERVAIS, P., WACHÉ, Y. & CAVIN, J.-F. Conidiation of *Penicillium camemberti* in submerged liquid cultures is dependent on the nitrogen source. en. *Biotechnology Letters* **38**, 329-335. ISSN : 0141-5492, 1573-6776 (fév. 2016).
185. PHAM, T. A., KIM, J.-J. & KIM, K. Optimization of Solid-State Fermentation for Improved Conidia Production of *Beauveria bassiana* as a Mycoinsecticide. *Mycobiology* **38**, 137-143 (2010).
186. JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**, 180-187. ISSN : 1367-5435, 1476-5535 (sept. 1997).
187. ITANI, A., SHIDA, Y. & OGASAWARA, W. A microfluidic device for simultaneous detection of enzyme secretion and elongation of a single hypha. eng. *Frontiers in Microbiology* **14**, 1125760. ISSN : 1664-302X (2023).