



HAL
open science

Comprendre les déterminants de résistance des micro-organismes aux procédés de stabilisation pour concevoir des itinéraires technologiques durables

Stephanie Passot

► To cite this version:

Stephanie Passot. Comprendre les déterminants de résistance des micro-organismes aux procédés de stabilisation pour concevoir des itinéraires technologiques durables. Génie des procédés. Université de Technologie de Compiègne (UTC), Compiègne, FRA., 2019. tel-04425274

HAL Id: tel-04425274

<https://agroparistech.hal.science/tel-04425274>

Submitted on 29 Jan 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.

**Dossier présenté en vue de l'obtention du diplôme
d'Habilitation à Diriger des Recherches
Université de Technologie de Compiègne**

**Comprendre les déterminants de résistance
des micro-organismes aux procédés de stabilisation
pour concevoir des itinéraires technologiques durables**

Stéphanie PASSOT
Maître de Conférences AgroParisTech
UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires

Soutenance prévue le 28 janvier 2019 devant le jury:

M. Olivier BALS	Maître de Conférences, UTC	Rapporteur
M. Romain JEANTET	Professeur, Agrocampus Ouest	Rapporteur
Mme Patricia TAILLANDIER	Professeur, INP de Toulouse	Rapporteur
Mme Raphaëlle TOURDOT-MARECHAL	Maître de Conférences, UB	Rapporteur
Mme Fernanda FONSECA	Directeur de Recherche, INRA	Examineur
Mme Michèle MARIN	Présidente du centre INRA, Toulouse	Examineur
M. Ioan Cristian TRELEA	Professeur, AgroParisTech	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce document est une synthèse des travaux de recherche que j'ai réalisés depuis une quinzaine d'années à l'UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires.

Pour commencer, je souhaite adresser mes sincères remerciements à chacun des membres du jury pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit : Olivier Bals, Romain Jeantet, Patricia Taillandier, Raphaëlle Tourdot-Marechal, Fernanda Fonseca, Michèle Marin et Cristian Tréléa. Je les remercie, par avance, des échanges que nous aurons, et qui seront pour moi d'une grande richesse afin de m'aider à mieux construire mes projets futurs.

Je voudrais particulièrement remercier Michèle Marin pour toute la confiance, qu'elle m'a accordée en m'accueillant en thèse, puis en m'offrant la possibilité de devenir enseignant-chercheur. Je n'aurais pu rêver d'un meilleur guide pour démarrer ma carrière de chercheur. Merci pour ton dynamisme, ton écoute, tes qualités humaines et scientifiques.

Comment trouver les mots justes pour exprimer tous mes remerciements et ma reconnaissance à Fernanda Fonseca. Merci pour ces quinze ans de collaboration scientifique et d'amitié sans faille. Ta rigueur scientifique, tes précieux conseils, tes questionnements, tes critiques constructives et ta bienveillance n'ont cessé de me faire progresser scientifiquement et humainement. Merci d'avoir accompagné mes premiers pas dans l'encadrement de doctorants et ton soutien dans certains moments difficiles. Je signe les yeux fermés pour quinze nouvelles années d'aventures scientifiques.

Je souhaite également remercier Cristian Tréléa, qui nous accompagne depuis le début, dans nos travaux sur la modélisation des procédés de stabilisation. Merci d'avoir toujours répondu présent à nos idées de projets, merci pour ton appui scientifique, tes conseils, et ta formule magique pour estimer le temps d'une tâche. J'en profite aussi pour remercier Bruno Perret pour sa disponibilité et son aide pour améliorer l'instrumentation de nos pilotes et la récupération de nos données.

Je remercie Frédéric Jamme et Paul Dumas pour leur soutien sans faille lors de nos expériences au synchrotron SOLEIL et nos discussions stimulantes et enrichissantes. Merci pour toutes ces belles nuits expérimentales et les mois de traitement de données associés.

Ce document n'existerait pas sans les doctorants, que je remercie vivement pour leurs contributions significatives aux travaux de recherche : Julie G, Inès, Julie M, Sichao, Hélène, Bernadette, sans oublier les étudiants en stage qui se sont succédés et que j'ai eu le plaisir à encadrer.

Tout ce travail a nécessité un fort investissement expérimental, qui a été mené de main de maître par Stéphanie Cénard, technicienne de recherche dans notre équipe. Dynamisme, autonomie, efficacité et rigueur sont quelques mots qui décrivent son travail.

Par ailleurs, pour un enseignant-chercheur, il est difficile de dissocier son activité de recherche de celle d'enseignement : le plaisir d'enseigner fait ainsi partie intégrante de mon quotidien, et je remercie tous mes collègues enseignants pour cet environnement stimulant, notamment Violaine, Marwen, Cristian, Anne, Sandra, Eric, Catherine, Sophie, Séverine, Claire, Marielle, Martine, Giana, Murielle, Bertrand, Hedi,

Stéphanie, Gérard, Véronique, Delphine, Marie-Noëlle... Merci à Martine pour son soutien et ses encouragements pour la rédaction de ce manuscrit. Merci à mon binôme Giana pour la coordination de la dominante Génie des Procédés et Production. Merci à mes collègues du génie des procédés pour nos discussions existentielles sur nos méthodes pédagogiques.

Enfin, un très grand merci à l'ensemble du personnel du laboratoire pour avoir, de près ou de loin, contribué à ces travaux de recherche.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	6
I. PRESENTATION PERSONNELLE ET CONTEXTE DES ACTIVITES DE RECHERCHE	7
I.1. CURRICULUM VITAE	8
I.2. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DES ACTIVITES DE RECHERCHE	11
<i>I.2.1. Cadre structurel et orientations scientifiques</i>	11
<i>I.2.2. Implication dans des projets de recherche</i>	12
II. SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE	15
II.1. CONTEXTE ET ENJEUX SCIENTIFIQUES	16
II.2. CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSIQUES ET BIOPHYSIQUES: DE LA MATRICE A LA CELLULE BACTERIENNE	21
<i>II.2.1 Analyse enthalpique différentielle et microscopie optique couplée à une cellule de cryodessiccation</i>	22
II.2.1.1. Caractérisation du phénomène d'effondrement de la matrice au cours de la lyophilisation	22
II.2.1.2. Analyse enthalpique différentielles à l'échelle de la cellule bactérienne	23
<i>II.2.2 La spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)</i>	25
II.2.2.1. Caractérisation de l'évolution des propriétés de la membrane avec la température	25
II.2.2.2. Caractérisation biochimique des populations bactériennes à l'échelle de la cellule unique	27
<i>II.2.3 L'anisotropie de fluorescence pour évaluer la fluidité membranaire</i>	28
II.3. COMPREHENSION DES MECANISMES DE DEGRADATION ET DE PROTECTION DES FONCTIONNALITES BIOLOGIQUES	30
<i>II.3.1 Modification des conditions de formulation et de conduite du procédé</i>	30
II.3.1.1. Effet du maintien à l'état vitreux sur la stabilité des fonctionnalités biologiques	30
II.3.1.2. Mécanismes d'action des molécules protectrices	31
<i>II.3.2 Modification des conditions de fermentation</i>	34
II.3.2.1. Une membrane fluide ou rigide, pour améliorer la résistance aux stress des procédés de lyophilisation et de congélation ?	34
II.3.2.2. Rôle des autres composants cellulaires dans la résistance des cellules bactériennes	37

II.4. CONCEPTION D'OUTILS D'AIDE A LA FORMULATION ET A LA CONDUITE DU PROCEDE DE LYOPHILISATION	39
<i>II.4.1 Deux leviers d'action pour améliorer le procédé de lyophilisation: la formulation et la conduite du procédé</i>	39
II.4.1.1. La rationalisation de la formulation protectrice	39
II.4.1.2. Influence du mode de conduite de l'étape de congélation sur la stabilité des fonctionnalités biologiques et la productivité du procédé de lyophilisation	40
II.4.1.3. Le développement de capteurs non invasifs pour le suivi du procédé de lyophilisation	41
<i>II.4.2 Apport de la modélisation : de l'échelle du procédé à l'échelle de la cellule</i>	41
II.4.2.1. Développement d'un logiciel d'aide au développement des cycles de lyophilisation (LyOptM)	41
II.4.2.2. Compréhension des phénomènes de transfert de chaleur et de matière lors du procédé de lyophilisation	42
II.4.2.3. Influence de la variabilité des coefficients de transfert de chaleur et de matière sur la qualité finale du produit	43
II.4.2.4 Modélisation à l'échelle de la cellule	44
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52
ANNEXES	58
Description de l'implication dans l'encadrement de thèses de doctorat	59
Listes des publications ordonnées par type	61
Liste des projets et contrats	68
Sélection de publications	72

INTRODUCTION

En raison de leur grande diversité, les agents biologiques (micro-organismes, protéines, enzymes, vaccins, cellules) offrent un large éventail de fonctionnalités indispensables dans les domaines alimentaires (aliments fermentés), biotechnologiques, pharmaceutiques (principes actifs, bactéries probiotiques) et cosmétiques. Cependant, les plus prometteurs de ces agents ne seront d'aucune utilité économique et sociétale, si la stabilité de leurs fonctionnalités ne peut être assurée tout au long de leur fabrication, distribution et stockage. La diminution de l'activité de l'eau constitue la principale stratégie de stabilisation des fonctionnalités biologiques, soit par le blocage de l'eau sous forme de cristaux de glace (congélation), soit par l'élimination quasi totale de l'eau (déshydratation). Les procédés de congélation et de lyophilisation sont souvent privilégiés industriellement, en raison de la thermosensibilité des agents biologiques. Cependant, ces procédés induisent des modifications importantes de leur environnement, générant des stress susceptibles de dégrader fortement leur fonctionnalité biologique. Par ailleurs, la conduite de ces procédés consommateurs en énergie et en temps, en particulier pour la lyophilisation, reste aujourd'hui encore empirique et souvent loin de l'optimum.

Depuis mon doctorat (2002-2005), je mène mes travaux de recherche au sein de l'UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA, AgroParisTech, INRA), sur les procédés de stabilisation d'agents biologiques selon trois axes principaux: i) la caractérisation des propriétés physiques, biochimiques et physiologiques du produit, incluant la matrice et l'agent biologique, au cours du procédé et du stockage; ii) la compréhension des mécanismes de dégradation et de protection des fonctionnalités et iii) la conception d'outils d'aide à la formulation des produits biologiques et à la conduite des procédés.

Maître de Conférences en Génie des Procédés au sein du Département SPAB (Sciences et Procédés des Aliments et Bioproduits) d'AgroParisTech, je suis intégrée au sein de l'équipe de recherche BioMiP, Bioproduits, Micro-organismes et Procédés, de l'UMR GMPA. L'objectif de cette équipe est de développer une approche systémique, pour comprendre et contrôler les mécanismes d'obtention et de préservation d'une fonctionnalité biologique dans une cascade de procédés, tout en limitant l'impact environnemental.

Ce document est une synthèse de mes travaux de recherche menés depuis 2002 et une réflexion sur les priorités à venir. Après une présentation du contexte dans lequel s'inscrivent mes activités de recherche, ce manuscrit exposera une partie de mes travaux, illustrant les trois axes de recherche portant sur l'obtention et la préservation de fonctionnalités biologiques. La dernière partie sera consacrée aux perspectives de ce travail de recherche, portant sur la conception d'itinéraires technologiques durables.

**I. PRESENTATION PERSONNELLE ET
CONTEXTE DES ACTIVITES DE RECHERCHE**

I.1. CURRICULUM VITAE

Stéphanie Passot

ETAT CIVIL ET ADRESSE PROFESSIONNELLE

née le 04 mai 1978 à Feurs (42), 40 ans

Maître de Conférences

Cneca section 3 (Mathématiques, Physique, Génie rural et industriel), 6^{ème} échelon depuis le 1^{er} janvier 2016

AgroParisTech - Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

Département SPAB, Sciences et Procédés des Aliments et Bioproduits

Unité Mixte de Recherche (UMR) 782 **Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires**

AgroParisTech, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université Paris Saclay

1 avenue Lucien Brétignières

78 850 Thiverval-Grignon

Tel: 01 30 81 59 40 – Fax: 01 30 81 55 97

email: stephanie.passot@agroparistech.fr ou stephanie.passot@inra.fr

CURSUS PROFESSIONNEL

- Depuis 2005 **Maître de Conférences en Génie des Procédés - AgroParisTech**
Département Sciences et Procédés des Aliments et des Bioproduits (SPAB)
UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA)
Activités d'enseignement: Génie des Procédés, Génie du Produit
Activités de recherche: Equipe Bioproduits, Micro-organismes et Procédés (BioMiP) dont
l'objectif est de développer une approche systémique, pour comprendre et contrôler les
mécanismes d'obtention et de préservation d'une fonctionnalité biologique dans une cascade
de procédés, tout en limitant l'impact environnemental.
- 2014 (3 mois)** *Séjour à l'Université de Cambridge au sein d'une start-up Asymptote*
- 2009 (2 mois)** *Séjour à l'Université du Minnesota (Minneapolis)*
- 2002 - 2005 **Institut National de la Recherche Agronomique**
UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (Thiverval-Grignon, 78)
Projet de recherche dans le cadre d'un contrat doctoral (financement européen) sur
l'amélioration du procédé de lyophilisation de protéines pharmaceutiques
Vacations d'enseignement: encadrement de travaux pratiques (AgroParisTech)
- 2001 - 2002 **MERIAL SAS, groupe pharmaceutique (Lyon, 69)**
Stage de fin d'études d'ingénieur suivi d'un CDD de 6 mois (assistante chef de projet)
Mission: développer des méthodes de suivi des cycles de lyophilisation

TITRES

- 2005 **Docteur de l'Institut national agronomique Paris-Grignon (AgroParisTech)**
Spécialité: Génie des Procédés, mention très honorable
Directeur de thèse: Michèle Marin, UMR GMPA
Thèse soutenue le 2 juin 2005 devant le jury composé de J. Andrieu (Université Lyon 1), J.L.
Cuq (Université de Montpellier), D. Rolland (bioMérieux), F. Fonseca (INRA, UMR GMPA) et
M. Marin (INA P-G, UMR GMPA)
- 2002 **Ingénieur de l'Institut national agronomique Paris-Grignon (AgroParisTech)**
Spécialité: Sciences et procédés alimentaires

ACTIVITES SCIENTIFIQUES

Thèmes de recherche et domaines de compétence

- Procédés de lyophilisation et de congélation appliqués aux produits biologiques (protéines, bactéries lactiques, cellules)
- Compréhension des mécanismes physiques et biologiques de dégradation des bactéries au cours des procédés (de la fermentation jusqu'à l'utilisation finale)
- Amélioration de la conduite de ces procédés afin d'optimiser la productivité et la résistance des bactéries

Domaines scientifiques: génie des procédés, génie du produit, génie microbiologique, biophysique

Outils analytiques: analyse enthalpique différentielle, freeze-drying microscopy, microscopie, spectroscopie infrarouge, caractérisation des produits lyophilisés

Production scientifique et valorisation de la recherche

- **30 publications dans des revues à comité de lecture**
6 en 1^{er} auteur et 9 en 2nd auteur
15 avec les doctorants avec participation à l'encadrement
20 avec des collaborateurs extérieurs à l'UMR GMMPA
- **3 chapitres d'ouvrages**
- **60 communications orales dont 28 conférences invitées et 16 posters**
- **1 brevet**

Encadrement doctoral et participation à des jurys

- Participation à l'encadrement de **7 projets doctoraux** (10-50 %)
- Encadrement de **13 stagiaires** (Master 1 et 2, licence, BTS, IUT)
- Membre d'un comité de thèse
- Participation à 1 jury de thèse (Gent University)
- Participation à 1 jury de concours de Chargé de Recherche INRA (Département CEPIA)
- Participation à la commission d'évaluation des ingénieur/e/s "Méthodes Pour la Recherche: Alimentation, nutrition (MPR3)
- Suppléante au conseil scientifique du Département CEPIA (INRA, 1 mandat)

Participation à des comités de lecture

Relecture d'articles pour différentes revues internationales à comité de lecture (environ 2 par an)

Expertise de projets de recherche (5)

Coordination et participation à des projets de recherche

Participation à différents projets de recherche collaboratifs: contribution à la définition et à la rédaction des projets, veille scientifique, organisation et supervision des expériences, valorisation des résultats

- **4 contrats institutionnels sur financement public** (1 projet européen, 2 projets ANR, 1 projet OSEO)
- **4 actions incitatives** du département CEPIA de l'INRA
- **5 contrats industriels**

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

Charge d'enseignement de 230 heq TD/an en moyenne

Orientation principale de l'activité pédagogique: Génie des Procédés, Génie du Produit

AgroParisTech - Cycle ingénieur: environ 200 h eq TD/an

- Co-responsabilité de la dominante d'approfondissement "Génie des Procédés et Production"
- Co-responsabilité de 3 unités d'enseignement dans les domaines de la technologie alimentaire
- Membre de l'équipe pédagogique de la formation par apprentissage

Master et formation continue: environ 30 h eq TD/an

Autres

- Participation au jury des concours B et apprentissage pour les écoles agronomiques et vétérinaires
- Membre de la commission apprentissage
- Formation sur le procédé de lyophilisation pour des industriels
- Membre de sociétés savantes: Society for Cryobiology, International Society of Lyophilization - Freeze-Drying

I.2. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DES ACTIVITES DE RECHERCHE

I.2.1. Cadre structurel et orientations scientifiques

L'ensemble de mes activités de recherche s'effectue au sein de l'Unité Mixte de Recherche 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA), entre AgroParisTech¹ et l'INRA², dont l'organigramme est présenté sur la **Figure 1**. L'unité, dirigée depuis janvier 2017 par Pascal Bonnarne, comprend 52 permanents, dont 34 scientifiques (14 AgroParisTech, 20 INRA), 18 assistants-ingénieurs et techniciens (6 AgroParisTech, 12 INRA, dont 4 administratifs) et 17 étudiants en thèse.

Les thématiques de recherche de l'UMR, portent sur la maîtrise des processus physiques et biologiques qui gouvernent les transformations, des bioprocédés jusqu'à l'homme, dans la perspective de délivrer des connaissances et des outils d'aide à l'élaboration de produits ou bioproduits de qualité (sensorielle, nutritionnelle, sanitaire et environnementale). Elles sont axées sur les écosystèmes microbiens fromagers, les processus de fermentation alimentaire et l'amélioration des opérations de fractionnement et de stabilisation pour l'obtention de fonctionnalités ciblées. Elles intègrent également la conduite automatique des bioprocédés, en passant par le développement de prototypes et d'outils de mesure, par la modélisation et l'intégration des connaissances. L'unité s'organise autour de 4 équipes de recherche:

- BioMiP: Bioproduits, Micro-organismes et Procédés,
- EcoMic: Ecosystèmes Microbiens des fromages,
- ADP: Aliments, Digestion et Perception,
- MALICES : Intégration des connaissances, Modélisation et analyse de systèmes ALimentaires et biologiques ComplexES.

Mes travaux de recherche s'inscrivent au sein de l'équipe BioMiP, animée par Fernanda Fonseca (Directrice de Recherche INRA) et Violaine Athès (Professeure AgroParisTech). L'équipe est composée de 13 scientifiques (2 INRA et 11 AgroParisTech), de 2 assistants ingénieurs et de 6 doctorants. L'équipe BioMiP a été créée en 2013, autour d'un thème commun de recherche: les procédés de transformation mettant en œuvre des micro-organismes, bactéries lactiques principalement, que ce soit pour l'élaboration de ferments concentrés stabilisés ou la production de biomolécules plateformes (**Figure 2**). Les enjeux sont de concevoir des itinéraires technologiques éco-conçus, pour obtenir ces fonctionnalités biologiques, et assurer leur stabilité jusqu'à leur utilisation finale. L'équipe mène ses actions de recherche en cohérence avec les programmes stratégiques des départements des tutelles :

- Département CEPIA³ de l'INRA : défis "Conception raisonnée de la qualité des aliments et des bioproduits" et "Développement de procédés et systèmes de production pour des produits durables" (*via* l'action "Concevoir des procédés couplés, intégrés selon une logique d'écoconception").

¹ AgroParisTech: Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement

² INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

³ CEPIA : Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture

- Département SPAB⁴ d'AgroParisTech : "Conception d'itinéraires technologiques éco-compatibles" pour l'obtention de produits alimentaires et non alimentaires biosourcés.

L'objectif scientifique de BioMiP est de comprendre les mécanismes gouvernant l'obtention et la stabilisation d'une fonctionnalité microbienne dans une cascade d'opérations unitaires, pour proposer de nouveaux itinéraires technologiques réduisant l'impact environnemental du système tout en maximisant la fonctionnalité. Notre stratégie de recherche s'appuie sur la combinaison d'approches de caractérisation des phénomènes mis en jeu par des méthodes *off-line* ou *in-situ*, de modélisation et d'optimisation multicritères (**Figure 2**). Elle se décline selon 4 axes principaux : (i) l'identification des déterminants physiques, biochimiques et physiologiques de résistance des micro-organismes aux stress associés aux procédés ; (ii) l'intensification et le couplage de procédés ; (iii) le développement d'outils d'aide à la décision et à la conduite des procédés ; (iv) l'écoconception de bioprocédés. L'originalité de notre démarche réside dans la prise en compte des différentes échelles d'observation, de l'échelle moléculaire au système global de production.

L'approche systémique, que nous souhaitons développer, allant de l'identification des gènes impliqués à l'évaluation de l'impact environnemental du système de production, nécessite la mobilisation de compétences pluridisciplinaires (biologie moléculaire, physiologie microbienne, génie microbiologique, génie des procédés, modélisation, écoconception) (**Figure 3**).

1.2.2. Implication dans des projets de recherche

Depuis mon arrivée, en 2005, dans l'UMR GMPA, en tant que Maître de Conférences, j'ai participé au montage et à la réalisation de plusieurs projets de recherche sur la stabilisation de divers produits biologiques (protéines, vaccins, bactéries lactiques). Ces projets s'inscrivent à travers des programmes de financement de nature différente (Europe, ANR, financements industriels) et sont présentés sur la **Figure 4**, dans le **Tableau 1** et en annexe.

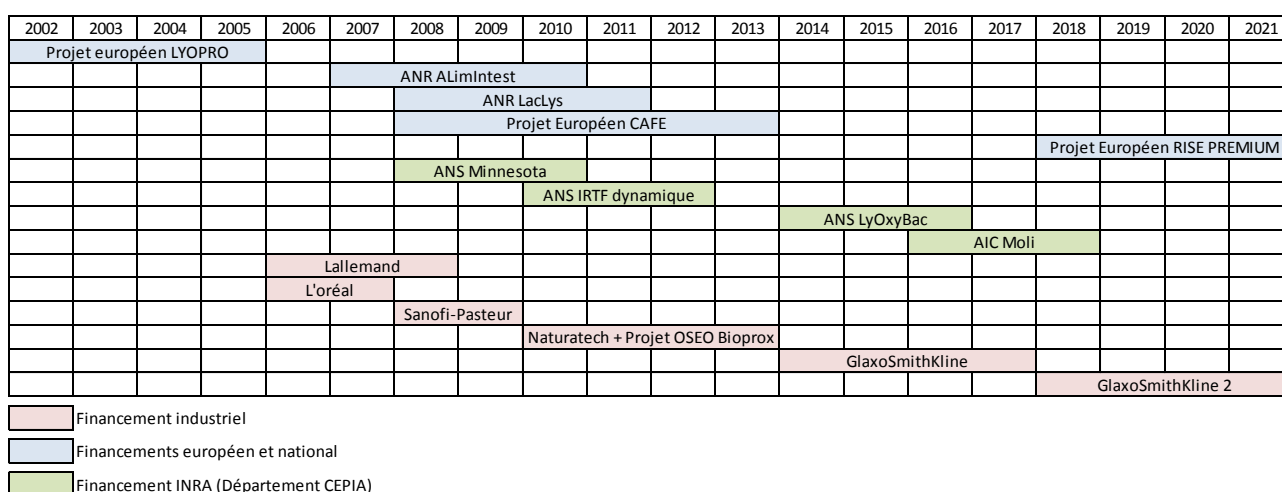


Figure 4 : Diagramme de Gantt des différents projets de recherche dans lesquels j'ai été impliquée
(ANS: Action Nouvelle Soutenue; AIC: Action Incitative Concertée)

⁴ SPAB: Sciences et Procédés des Aliments et des Bioproduits

Tableau 1 : Description succincte des différents projets de recherche mentionnés sur la Figure 4.

LYOPRO (thèse)	Optimisation and control of freeze drying of pharmaceutical proteins (5 ^{ème} PCRD)
AlimIntest	Effet de régimes alimentaires contrôlés sur la dynamique structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal humain
LacLys	Elaboration de microstructures à partir de protéines alimentaires (α -lactalbumine et lysozyme): mécanismes et propriétés
CAFE	Computer-aided food processes for control engineering (7 ^{ème} PCRD)
PREMIUM	Preservation of micro-organisms by understanding the protective mechanisms of oligosaccharides (RISE: Research and Innovation Staff Exchange)
ANS Minnesota	Congélation des bioproduits: Bio-transferts (mécanismes et modélisation)
ANS IRTF dynamique	Etude in situ par microspectroscopie infrarouge du comportement biophysique des bactéries lactiques lors des procédés de congélation/décongélation et déshydratation
ANS LyOxyBac	Identification de marqueurs d'oxydation lors de la production de bactéries lactiques lyophilisées
AIC Moli	Model Lipid Membranes of Lactic Acid Bacteria
Lallemand	Etude de l'amélioration de la conservation, sur une durée de 12 à 24 mois, en terme de viabilité et d'activité biologique, de concentrés bactériens lyophilisés, incluant la définition de nouvelles formules et les procédés d'obtention des concentrés. Etude du procédé de lyophilisation couplé à une étape de congélation en granulés
L'Oréal	Lyophilisation du plancton thermal et définition de formules cryoprotectrices adaptées afin d'en optimiser l'intérêt en cosmétique
Sanofi-Pasteur	Etude comparative de deux méthodes de détermination de la teneur en eau résiduelle de matrices pharmaceutiques lyophilisées
Naturatech	Amélioration de la conservation (viabilité et activité biologique) de concentrés bactériens lyophilisés de <i>Lactococcus cremoris</i> 20137.
Projet Oseo Bioprox	Amélioration du procédé de préparation de concentrés lyophilisés de bactéries lactiques
GlaxoSmithKline	Mathematical modelling of the freeze-drying process: mechanisms responsible for product heterogeneity and scale-up risks
GlaxoSmithKline 2	From high throughput to conventional vials freeze-drying: mathematical modelling of the mechanisms responsible for product heterogeneity and device change risks

La complexité et la pluridisciplinarité des phénomènes, mis en jeu lors de la stabilisation de fonctionnalités bactériennes, ont nécessité la mise en place de collaborations internes, pour l'instrumentation et la modélisation des procédés (équipe MALICES), et externes à l'unité (**Figure 5**). Au sein du département CEPIA de l'INRA, les collaborations concernent la représentation et la simulation numérique des phénomènes de transferts de chaleur et de matière, lors du procédé de lyophilisation (UMR GENIAL⁵), et la stabilisation d'autres objets biologiques (microsphères protéiques, UMR STLO⁶). Depuis 2011, un partenariat étroit avec les chercheurs du synchrotron SOLEIL⁷ (lignes de lumière SMIS⁸ et DISCO⁹) a été établi, pour étudier à l'échelle de la cellule unique le comportement biophysique et biochimique des bactéries, lors des procédés de congélation et de déshydratation. L'observation de la cellule unique a permis des avancées conséquentes dans la compréhension des mécanismes de résistance à la congélation. Sur le plan international, des relations privilégiées ont été développées avec le Dr G. J. Morris (Asymptote GE-Healthcare, Cambridge), sur l'étude des mécanismes de dégradation cellulaire lors de la congélation, et avec le Pr J. Bishof (Université du Minnesota, USA), pour quantifier et modéliser le transfert d'eau cellulaire lors

⁵ UMR GENIAL : UMR Ingénierie Procédés Aliments

⁶ UMR STLO : UMR Sciences et Technologie du Lait et de L'Oeuf

⁷ SOLEIL : Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE

⁸ SMIS : Spectroscopie et Microscopie dans l'Infrarouge utilisant le Synchrotron

⁹ DISCO : Dichroïsme, Imagerie, Spectrométrie de Masse pour la Chimie et la biologie

de la congélation. Cet environnement scientifique est complété par de nombreux partenariats industriels, français et étrangers (Lallemand, L'Oréal, Soredab, Bioprox, GlaxoSmithKline). La richesse de ce partenariat a permis un bon équilibre entre recherche fondamentale et recherche appliquée, et d'assurer un transfert de connaissances et de méthodes. La diversité des modèles biologiques étudiés garantit la généralisation des mécanismes de dégradation et de protection des fonctionnalités, et la validation des outils d'aide à la décision développés.

II. SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

II.1. CONTEXTE ET ENJEUX SCIENTIFIQUES

Mes travaux de recherche sont orientés sur les procédés de stabilisation d'agent biologiques, micro-organismes, protéines, et concernent principalement la maîtrise des procédés de lyophilisation et de congélation et l'amélioration de la stabilité à long terme de leurs fonctionnalités. Le savoir-faire développé au sein de l'UMR GMPA depuis sa création, sur la production et la caractérisation de ferments lactiques, a désigné tout naturellement mon principal modèle d'étude: les bactéries lactiques et notamment *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *L. bulgaricus* est une bactérie thermophile, largement utilisée dans la fabrication de yaourts et de laits fermentés, très sensible aux procédés de stabilisation.

Le processus de production de ferments lactiques sous une forme concentrée et lyophilisée implique une succession d'étapes illustrées sur la **Figure 6**. L'étape de fermentation permet la génération d'un grand nombre de cellules et l'élaboration de la fonctionnalité d'intérêt (activité acidifiante). Elle est réalisée en mode discontinu dans des conditions contrôlées de température, pH, aération et agitation. Lorsque la concentration en cellule et/ou la fonctionnalité souhaitée sont atteintes, la fermentation est arrêtée par refroidissement de la culture, afin de ralentir et stopper l'activité métabolique des bactéries. Puis les cellules sont concentrées par centrifugation, pour éliminer la majeure partie du milieu de culture par centrifugation. Des molécules protectrices, par exemple des sucres, sont ensuite ajoutées à la suspension bactérienne concentrée pour assurer la survie des cellules lors des étapes de lyophilisation et de stockage (Béal et al., 2008). La lyophilisation est un procédé de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans le produit. Par abaissement de l'activité de l'eau, les vitesses des réactions physiques et biochimiques sont fortement ralenties et une conservation à long terme du produit est possible. Le produit lyophilisé est broyé en une poudre fine et conditionné sous vide ou atmosphère inerte dans des sachets métalloplastiques étanches à l'eau, aux gaz et à la lumière. Les poudres lyophilisées sont stockées à des températures pouvant varier de -20°C à 4 °C.

Les étapes postérieures à la fermentation induisent des modifications importantes de l'environnement des cellules (température, concentration, etc.), responsables de modifications biophysiques et biochimiques de la structure cellulaire mise en place lors de la fermentation, modifications susceptibles d'entraîner une dégradation de la fonctionnalité bactérienne. Le **Tableau 2** synthétise, pour les différentes étapes du procédé de lyophilisation, les phénomènes physiques impliqués, les modifications environnementales, les réponses passives des cellules qui en résultent et les dommages cellulaires potentiels. Les modifications environnementales, observées à chaque étape, peuvent être associées à des stress subits par la cellule bactérienne.

Tableau 2 : Modifications environnementales induites par les différentes étapes du procédé de lyophilisation, réponses cellulaires, dommages cellulaires et types de stress associés

Etape de lyophilisation	Événements physiques et modifications des conditions environnementales	Réponses passives de la cellule Dommages cellulaires potentiels	Type de "stress"
Congélation	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Abaissement de la température (~-50°C) ✓ Formation et croissance des cristaux de glace ✓ Augmentation de la concentration en solutés (cryoconcentration) ✓ Augmentation de la viscosité de la matrice cryoconcentrée 	<ul style="list-style-type: none"> → Dénaturation des protéines → Rigidification de la membrane => Déshydratation cellulaire (réduction du volume) → Perte d'intégrité de la membrane 	Froid, Osmotique, Mécanique
Dessiccation primaire	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sublimation de la glace ✓ Faible température (~ -30°C, -20°C) 	<ul style="list-style-type: none"> → Dénaturation des protéines 	Froid
Dessiccation secondaire	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Désorption de l'eau non congelable ✓ Rupture des liaisons hydrogène entre l'eau et les protéines, et l'eau et les têtes des phospholipides membranaires ✓ Températures modérées (25 à 40°C) 	<ul style="list-style-type: none"> → Dénaturation des protéines → Rigidification de la membrane 	Mécanique
Stockage	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Migration d'eau, augmentation de la mobilité moléculaire ✓ Réactions de dégradation physique et chimique (agrégation, oxydation, etc.) ✓ Cristallisation de solutés (Rupture des liaisons hydrogène) ✓ Températures modérées (-20 °C à 25 °C) 	<ul style="list-style-type: none"> → Oxydation des protéines et des lipides → Dénaturation des protéines 	Oxydatif Mécanique
Réhydratation	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Réduction de la concentration en solutés ✓ Températures modérées (25 °C) 	<ul style="list-style-type: none"> → Adsorption aux interfaces (air-eau, eau-container) → Dénaturation des protéines → "Fluidification de la membrane" → Perte d'intégrité de la membrane 	Mécanique Osmotique

La **Figure 7** schématise l'évolution de la température et de la teneur en eau du produit au cours du procédé de lyophilisation, ainsi que l'évolution d'une matrice composée initialement de 5 % de saccharose et de bactéries lactiques (représentées par des bâtonnets oranges). Au cours de la congélation, la température du produit est abaissée jusqu'à environ -50 °C et la majeure partie de l'eau (70-85 %) est convertie en glace. La formation des cristaux de glace induit une cryoconcentration des solutés et des cellules bactériennes au sein de la matrice. Partant d'une solution de saccharose à 5 %, les cellules se retrouvent exposées à une concentration en saccharose pouvant atteindre 80 % en fin de congélation. Cette cryoconcentration en solutés entraîne une augmentation de la pression osmotique extracellulaire, qui induit une migration de l'eau intracellulaire vers le milieu extracellulaire et une réduction du volume cellulaire (Fonseca et al., 2006; Mazur, 1977). A la fin de l'étape de congélation, la phase cryoconcentrée entourant les cristaux de glace est caractérisée par une viscosité excessivement élevée, qui lui confère les propriétés de l'état solide amorphe et les bactéries se retrouvent immobilisées au sein d'une matrice vitreuse.

L'étape de dessiccation primaire commence, lorsque la solution congelée placée sous vide, est progressivement chauffée afin d'initier la sublimation de la glace. La température du produit doit cependant rester inférieure à une valeur seuil, correspondant à la température d'effondrement ou de collapse (Tim ou

Tcoll). Si cette valeur est dépassée au cours de la sublimation, le produit peut subir des dégradations physiques comme un rétrécissement, voire l'effondrement total de sa structure poreuse (Pikal and Shah, 1990). Grâce à un condenseur maintenu à une faible température ($< -60^{\circ}\text{C}$), la vapeur d'eau migre du front de sublimation, zone de pression partielle de vapeur d'eau élevée, jusqu'au condenseur, zone de très faible pression partielle de vapeur d'eau ($\ll 1 \text{ Pa}$), où la vapeur d'eau est convertie en glace. L'étape de sublimation n'induit donc pas de modification environnementale importante pour les cellules bactériennes immobilisées au sein d'une phase vitreuse.

Lorsque toute la glace a été éliminée du produit, le risque de fusion n'existe plus et la température du produit peut être augmentée lors de l'étape suivante, la dessiccation secondaire. La désorption de l'eau non congelée est alors favorisée par des températures de produit « élevées » (25 à 40°C). En fin de dessiccation secondaire, le produit lyophilisé présente une teneur en eau résiduelle très faible ($< 3\%$), nécessaire à la stabilité à long terme du produit. En milieu aqueux, les membranes phospholipidiques et les protéines sont entourées d'une monocouche de molécules d'eau, appelée "enveloppe d'hydratation" qui les maintient dans leur état fonctionnel. Même si la majorité de l'eau a été éliminée, de la phase contenant les bactéries, lors de l'étape de congélation, l'eau non congelée restante, stabilise les membranes et les protéines par établissement de liaisons hydrogènes avec ces dernières. L'élimination de cette eau non congelée de la phase cryoconcentrée constitue le principal stress subit par la protéine au cours de la déshydratation. La rupture des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les constituants biologiques (membranes et protéines), peut altérer considérablement leur structure et leur organisation (stress mécanique).

Lors du stockage des bactéries lactiques, les réactions d'oxydation constituent un réel problème entraînant des pertes de fonctionnalités importantes. Ces réactions peuvent être limitées si les échantillons lyophilisés sont stockés sous une atmosphère inerte (azote) ou sous vide (Castro et al., 1995; Kurtmann et al., 2009).

La **Figure 8** illustre les différentes stratégies permettant de limiter les dégradations cellulaires induites par le procédé de lyophilisation et le stockage. Ces stratégies reposent, soit sur l'ajout de molécules protectrices avant le procédé de lyophilisation, soit sur les variables opératoires de conduite du procédé. Dans la nature, certains organismes sont capables de survivre à des conditions extrêmes de température et de déshydratation. Pour s'adapter à des températures négatives, les organismes accumulent une variété de composés (osmolytes), aboutissant à l'augmentation de la pression osmotique du cytoplasme (Arakawa et al., 2001). En revanche, les organismes résistants à une déshydratation intense, stockent essentiellement des disaccharides, comme le tréhalose ou le saccharose dans leur cytoplasme (Crowe et al., 1998; Crowe et al., 1983; Crowe et al., 1992; Wolkers and Hoekstra, 2003). Les solutés accumulés protègent les macromolécules, protéines et enzymes, nécessaires aux activités métaboliques de ces organismes. Par transposition, ces solutés protecteurs ont été proposés pour la stabilisation des protéines et des bactéries lors du procédé de lyophilisation (Crowe et al. 1990; Crowe et al., 1983; Crowe et al., 1996; Leslie et al., 1995; Santivarangkna et al., 2011; Santivarangkna et al., 2008; Santoro et al., 1992). Les principaux mécanismes d'action, rapportés dans la littérature, de ces molécules peuvent être classés en deux catégories: i) les

mécanismes thermodynamiques comme l'exclusion préférentielle (congélation) et le remplacement des molécules d'eau (déshydratation) et ii) les mécanismes purement cinétiques comme l'immobilisation au sein d'une matrice vitreuse (Pikal, 1999). Un matériau vitreux est caractérisé par une viscosité extrêmement élevée, réduisant ainsi la mobilité moléculaire et bloquant toute réaction de dégradation contrôlée par la diffusion. Le maintien de cet état vitreux, tout au long du procédé et du stockage, est donc primordial pour assurer la stabilité des fonctionnalités biologiques. Le **Tableau 3** regroupe les principales molécules protectrices utilisées lors de la lyophilisation de bactéries lactiques et de protéines, classées selon leur mécanisme d'action.

Tableau 3 : Liste des solutés classés selon leurs mécanismes de protection

Mode d'action	Famille	Exemples de molécules
Exclusion préférentielle	Sucres Polyols	Saccharose, lactose, glucose, tréhalose, maltose Inositol, éthylène glycol, glycérol, sorbitol, xylitol, mannitol, 2-méthyl-2,4-pentanediol
	Acides aminés	Glutamate de sodium, proline, α -alanine, β -alanine, glycine, lysine-HCl, 4-hydroxyproline
	Polymères	PEG, dextrane, PVP
	Sels inorganiques	Sulfate de sodium, sulfate d'ammonium, phosphate de potassium, sulfate de magnésium, fluorure de sodium
	Sels organiques	Sodium acétate, polyéthylène de sodium, caprylate de sodium, propionate, lactate, succinate
	Divers	TriméthylamineN-oxyde, sarcosine, bétaine, acide γ -aminobutyrique, octopine, alanopine, strombine, diméthylsulfoxyde, éthanol
Liaisons hydrogène	Disaccharides	Tréhalose, saccharose, lactose, maltose
	Sucres	Raffinose, glucose
	Polyols	Glycérol, inositol, mannitol
Vitrification	Sucres	Saccharose, lactose, glucose, tréhalose, maltose, raffinose, maltotriose
	Polyols	Glycérol, sorbitol, mannitol, inositol
	Protéines	Gélatine, BSA, HSA
	Polymères	Dextrane, PVP, PVA, ficoll, hydroxyéthyle d'amidon, maltodextrine

PEG : polyéthylène glycol ; PVP : polyvinylpyrrolidone ; BSA : albumine de sérum bovin ;
HSA : albumine de sérum humain ; PVA : alcool polyvinique

Les bactéries présentent des capacités d'adaptation remarquables à certains stress physico-chimiques modérés, rencontrés dans leur environnement. La réponse adaptative des bactéries s'opère par le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes, aboutissant à un état de tolérance. Cependant, lors du procédé de lyophilisation, en raison des faibles températures, les cellules bactériennes sont dans un état métabolique inactif, et donc incapables de s'adapter aux changements environnementaux rencontrés. Une dernière stratégie permettant de limiter les dommages cellulaires, repose sur la modification de l'étape de fermentation afin d'obtenir des cellules résistantes aux différents stress du procédé. En contrôlant activement

les propriétés biophysiques des cellules, et notamment de la membrane plasmique, il est possible de moduler la réponse passive des cellules aux changements environnementaux et donc les dommages cellulaires associés. De nombreuses études ont montré que la composition du milieu de culture (sources de carbone, d'azote, de minéraux, d'acides gras et de vitamines), la température, le pH, la phase de croissance, peuvent affecter l'état physiologique des bactéries et donc indirectement leur résistance à la stabilisation et au stockage (Broadbent and Lin, 1999; Fonseca et al., 2001; Hua et al., 2009; Li et al., 2009; Rault et al., 2010; Schoug et al., 2008; Streit et al., 2007; Velly et al., 2014; Wang et al., 2005a; Wang et al., 2005b; Zhao et al., 2009).

Les travaux de recherche sont aujourd'hui abondants sur la lyophilisation de protéines pharmaceutiques, mais restent limités et incomplets sur les bactéries lactiques. De nombreuses espèces bactériennes présentent un faible taux de survie après lyophilisation. Stabiliser les fonctionnalités de ces dernières jusqu'à leur usage commercial, nécessite une meilleure connaissance des mécanismes gouvernant leur stabilité à long terme. Par ailleurs, dans un contexte de durabilité des produits, l'amélioration de la productivité du procédé de lyophilisation et la réduction des coûts de stockage constituent un enjeu important.

La démarche scientifique que nous appliquons, au sein de l'équipe BioMiP, pour l'étude des phénomènes mis en jeu lors de la stabilisation d'agents biologiques, se décline selon 3 axes de recherche:

- 1). La caractérisation physique, biochimique et physiologique du comportement du produit, incluant la matrice et l'agent biologique, au cours des procédés de stabilisation et du stockage,
- 2). La compréhension des mécanismes de dégradation et de protection des fonctionnalités,
- 3). La conception d'outils d'aide à la formulation et la conduite du procédé (= l'ingénierie du produit et du procédé).

II.2. CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSIQUES ET BIOPHYSIQUES: DE LA MATRICE A LA CELLULE BACTERIENNE

L'identification des propriétés clés de la matrice extracellulaire et de la cellule bactérienne gouvernant non seulement la stabilité de la fonctionnalité biologique, mais aussi la conduite du procédé, requiert une caractérisation approfondie du comportement physique et biochimique du matériau, au cours du procédé de l'échelle macroscopique de la matrice à l'échelle microscopique de la cellule. Cet axe a nécessité des développements méthodologiques importants avec la recherche de méthodes non invasives, *in situ* et en dynamique. Le **Tableau 3** résume l'ensemble des méthodes mise en œuvre au sein de l'équipe, les échelles d'observations et les propriétés obtenues.

Tableau 4 : Liste des méthodes analytiques mises en œuvre au sein de l'équipe BioMiP et publications associées

METHODE D'ANALYSE	ECHELLE D'OBSERVATION	DONNEES OBTENUES	REFERENCES
Analyse enthalpique différentielle (AED ou DSC)	Matrice	<ul style="list-style-type: none"> • Changements d'état physique (cristallisation, fusion, transition vitreuse) • Variation d'enthalpie et de chaleur spécifique associée 	(Passot et al., 2005) (protéine) (Passot et al., 2007) (protéine) (Passot et al., 2010c) (Fonseca et al., 2007) (bactéries)
		<ul style="list-style-type: none"> • Transition vitreuse intracellulaire • Formation de glace intracellulaire 	(Fonseca et al., 2015) (cellules mammifères) (Fonseca et al., 2016) (bactéries, levures)
		<ul style="list-style-type: none"> • Déshydratation cellulaire au cours de la congélation (coefficient de perméabilité à l'eau de la membrane cellulaire) 	(Passot et al., 2010b) (bactéries) Université du Minnesota
		<ul style="list-style-type: none"> • Diagramme d'état (relation entre T_g, activité de l'eau, teneur en eau) 	(Passot et al., 2012b) (bactéries) (Passot et al., 2010a) (bactéries) (Passot et al., 2006) (protéines)
Cellule de cryodessiccation couplée à la microscopie optique (FDM)	Matrice	<ul style="list-style-type: none"> • Effondrement de la matrice lors de la sublimation 	(Passot et al., 2005) (protéine) (Fonseca et al., 2004a) (bactéries) (Fonseca et al., 2004b) (bactéries) (Passot et al., 2010c) (Fonseca et al., 2004c) (bactéries) (Fonseca et al., 2003b) (bactéries)
	Objet biologique (assemblage protéique, cellule unique)	<ul style="list-style-type: none"> • Couplage avec sonde fluorescente, suivi de la taille, position de l'objet en dynamique lors du procédé de congélation ou lyophilisation 	(Passot et al., 2011a) (microsphères protéiques)
Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)	Matrice et population bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi en dynamique (température) de l'état physique de constituants biochimiques de la matrice ou des cellules • Transition de phase des lipides (T_m) • Dénaturation des protéines • Cristallisation, fusion de l'eau (nucléation) • Niveau d'hydratation des groupements phosphate • Transition vitreuse (sucres) 	(Oldenhof et al., 2005) (bactéries, protéines) (Gautier et al., 2013) (bactéries) (Meneghel et al., 2017b) (bactéries) (Meneghel et al., 2015c) (bactéries)

Tableau 4 (suite) : Liste des méthodes analytiques mises en œuvre au sein de l'équipe BioMiP
et publications associées

METHODE D'ANALYSE	ECHELLE D'OBSERVATION	DONNEES OBTENUES	REFERENCES
Micro-spectroscopie Raman	Cellule unique	<ul style="list-style-type: none"> Composition biochimique cellulaire 	(Meneghel et al., 2015d) (bactéries)
Micro-spectroscopie IRTF couplée au rayonnement synchrotron Ligne SMIS de SOLEIL	Cellule unique	<ul style="list-style-type: none"> Composition biochimique cellulaire (état déshydraté et état hydraté) Couplage avec sondes fluorescentes pour caractériser l'état physiologique des cellules (état déshydraté) Suivi en dynamique de l'hydratation, déshydratation de cellule 	(Passot et al., 2015) (bactéries) (Nguyen et al., 2017) (levures) (Gautier et al., 2012) (bactérie) (Fonseca et al., 2011) (bactérie) (Meneghel et al., 2015a) (bactérie), poster
Anisotropie de fluorescence	Population bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> Fluidité membranaire 	(Velly et al., 2015) (bactéries) (Meneghel et al., 2017b) (bactéries)
	Cellule unique (Ligne DISCO de SOLEIL)	<ul style="list-style-type: none"> Cartographie cellulaire de la fluidité membranaire Identification de domaines lipidiques 	(Passot et al., 2014b) (bactéries) (Meneghel et al., 2017a) (bactéries) (Meneghel et al., 2015b) (bactéries) (Passot et al., 2013) (bactéries)
Compteur Coulteur	Objet biologique (assemblage protéique, cellule unique)	<ul style="list-style-type: none"> Taille de l'objet 	(Passot et al., 2010b) (bactéries) (Passot et al., 2011a) (microsphères protéiques)
Autres méthodes: composition en acides gras membranaires (population bactérienne), teneur en eau (matrice), activité de l'eau (matrice)			

(Références notées en bleu : articles scientifiques ; références notées en vert : communications orales ; références en noir : chapitres d'ouvrages)

DSC : Differential Scanning Calorimetry / FDM : Freeze-Drying Microscopy / IRTF : InfraRouge à Transformée de Fourier / Tg : température de transition vitreuse / Tm : température de transition de phase des lipides

II.2.1 Analyse enthalpique différentielle et microscopie optique couplée à une cellule de cryodessiccation

II.2.1.1. Caractérisation du phénomène d'effondrement de la matrice au cours de la lyophilisation

La connaissance des propriétés physiques d'une formulation, comme les températures de transition vitreuse, d'eutectique et d'effondrement, est indispensable pour déterminer de façon rationnelle les conditions opératoires du cycle de lyophilisation, notamment celle de la dessiccation primaire, l'étape la plus longue du procédé. Mes travaux de thèse (2002-2005) se sont appuyés principalement sur deux outils analytiques, l'analyse enthalpique différentielle (AED ou DSC) et une cellule de cryodessiccation associée à un microscope, afin d'étudier le comportement physique d'une large gamme de formulations de protéine pharmaceutique et de suspensions bactériennes lors des différentes étapes du procédé de lyophilisation (Passot et al., 2005; Passot et al., 2007; Passot et al., 2010c).

L'obtention d'un produit lyophilisé effondré, résultant de la perte de la structure poreuse lors de la sublimation de la glace, risque de compromettre non seulement le broyage du ferment lyophilisé, mais également la stabilité de la fonctionnalité biologique. L'effondrement de la matrice est couramment expliquée par une température de produit au cours de l'étape de sublimation, dépassant la température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum (Tg'), déterminée par analyse enthalpique différentielle (**Figure 9A**). Les thermogrammes obtenus dans le cadre d'échantillons complexes peuvent être

caractérisés par plusieurs événements de transition vitreuse. Par exemple, le thermogramme d'une solution de saccharose à 10 % (**Figure 9B**) présente deux événements de transition vitreuse ($Tg'_1 = -45$ °C et $Tg'_2 = -33$ °C). Une cellule de cryodessiccation installée sur un microscope optique (**Figure 9C**) permet l'observation directe de l'évolution de la structure physique du produit au front de sublimation en fonction de la température de l'échantillon (**Figure 9D**). La température d'effondrement est définie comme la température à partir de laquelle la sublimation de la glace s'accompagne d'une dégradation de la structure de la partie sèche ($T_{coll} = -32$ °C, **Figure 9D**). Pour des solutions binaires simples, la température d'effondrement est associée à la valeur la plus élevée de température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée (Tg'_2) mesurée par analyse enthalpique différentielle (Fonseca et al., 2004a).

Pour l'étude des suspensions bactériennes, un protocole de mesure de la température d'effondrement lors de l'étape de sublimation, a été mis au point, permettant de caractériser le comportement du produit par deux températures, la température de micro-collaps ($T_{\mu coll}$) et la température de collaps (T_{coll}) (Fonseca et al., 2004a). Des cycles de lyophilisation, réalisés à différentes valeurs de température de produit au cours de l'étape de sublimation, a permis de définir la température de collaps comme la valeur de température critique à ne pas dépasser lors de la sublimation, pour éviter le phénomène d'effondrement. Contrairement aux solutions binaires simples, les suspensions bactériennes présentent des températures de transition vitreuse et de collaps significativement différentes, de l'ordre de 10 °C (**Figure 10**). Nous avons montré, que la présence de cellules bactériennes dans une solution, tend à augmenter la température de collaps (Fonseca et al., 2004a). Les bactéries confèrent à la matrice une certaine résistance mécanique lors de la sublimation de la glace. L'influence de la concentration en cellule et de la morphologie de la bactérie, sur les propriétés physiques de la matrice a été étudiée (Fonseca et al., 2004b).

Dans le cadre du projet ANR Laclys (2007-2010), coordonné par Saïd Bouhallah, Directeur de Recherche à l'UMR STLO¹⁰), la cellule de cryodessiccation a été utilisée pour suivre le comportement de microsphères protéiques composées d' α -lactalbumine et de lysozyme lors des étapes de congélation et sublimation. Des microsphères marquées par la rhodamine B isothiocyanate (molécule fluorescente après excitation à 543 nm) ont été congelées et lyophilisées dans la cellule de cryodessiccation. Le marquage fluorescent a permis de localiser les microsphères dans la matrice congelée, puis lyophilisée et d'observer des changements de taille, des phénomènes de cryoconcentration des sphères.

II.2.1.2. Analyse enthalpique différentielle à l'échelle de la cellule bactérienne

L'analyse enthalpique différentielle (AED) a également été utilisée pour obtenir différentes informations sur le comportement des cellules bactériennes, lors de l'étape de congélation: i) la quantification de la déshydratation cellulaire associée à la cryoconcentration du milieu extracellulaire; ii) la formation de glace intracellulaire et iii) la vitrification du contenu intracellulaire.

Lors d'un séjour de 2 mois à l'Université du Minnesota (Department of Mechanical Engineering), j'ai

¹⁰ UMR STLO: Unité Mixte de Recherche Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA Agrocampus Ouest

pu me former à la technique d'AED développée par l'équipe du Pr J. Bishof, de quantification du transport d'eau au travers de la membrane de cellules de mammifères lors de la congélation (Devireddy et al., 1998). Cette technique indépendante de la forme de la cellule considérée, semblait très prometteuse pour l'étude de cellules bactériennes non sphériques, comme les cellules de *L. bulgaricus*. L'objectif était d'appliquer cette méthode à notre objet d'étude, pour estimer le coefficient de perméabilité à l'eau de la membrane bactérienne et de pouvoir modéliser le phénomène biophysique de déshydratation cellulaire, intervenant lors de la cryoconcentration du milieu extracellulaire. Cependant, cette technique s'est révélée non applicable aux bactéries lactiques, en raison d'un problème de reproductibilité des essais expérimentaux et de validation des résultats. Nous avons mis au point un protocole de déshydratation osmotique des cellules bactériennes, dans des solutions de saccharose, et de mesure du volume cellulaire par un compteur Coulteur®. Les mesures ont été réalisées à différents temps d'exposition et températures. Les valeurs de coefficient de perméabilité à l'eau de la membrane et d'énergie d'activation ont pu ainsi être obtenues, ce qui a permis de modéliser l'évolution du volume cellulaire lors de la congélation (Passot et al., 2012a; Passot et al., 2010b).

Grâce à l'amélioration de la sensibilité des équipements d'AED, des protocoles expérimentaux ont été établis pour mesurer la température de transition vitreuse du contenu intracellulaire (Clarke et al., 2013) et détecter la formation de glace intracellulaire au cours de la congélation (Fonseca et al., 2016). Le milieu intracellulaire, riche en protéines, est un milieu extrêmement encombré et sa structure physique peut être assimilée à celle d'un colloïde. La déshydratation cellulaire, associée au transfert d'eau vers le milieu extracellulaire induit par le phénomène de cryoconcentration extracellulaire, entraîne la vitrification du contenu intracellulaire. L'effet des conditions de culture, de la nature des molécules protectrices, sur la température de transition vitreuse intracellulaire, et la relation entre cette propriété et la survie bactérienne à la congélation, ont été étudiés. En comparant les résultats obtenus pour le saccharose, le glycérol et le DMSO (diméthylsulfoxyde), nous avons montré que la viabilité cellulaire, après congélation, est corrélée à la température de transition de transition vitreuse intracellulaire (Tg'_i). Les cellules de *L. bulgaricus* CFL1, dont la vitrification intracellulaire a lieu à de faibles valeurs de température, présentent une meilleure résistance à la congélation que les cellules caractérisées par des valeurs élevées de Tg'_i . Le maintien de cellules osmotiquement actives, sur une large plage de température, serait donc bénéfique et limiterait les dommages induits par la congélation (Fonseca et al., 2016). La **Figure 11** illustre la détection de la formation de glace intracellulaire, lors de la congélation de cellule de *Saccharomyces cerevisiae* par AED (**Figure 11A**) et par cryomicroscopie électronique à balayage CryoSEM (**Figure 11B**). Les thermogrammes obtenus, lors de la congélation de *Saccharomyces cerevisiae* à 50 °C/min (courbes rouges) et 2 °C/min (courbes bleues), présentent un pic exothermique vers -10 °C (lettre A), correspondant à la formation de glace dans le milieu extracellulaire (**Figure 11A**). Un pic exothermique supplémentaire est observé vers -20 °C (lettre B), dans le cas de l'application d'une vitesse de refroidissement de 50 °C/min, attribué, en accord avec les images de CryoSEM, à la formation de glace intracellulaire. Sur les images CryoSEM de cellules fracturées, la glace intracellulaire apparaît nettement comme de larges espaces vides au sein du cytoplasme. Dans le cas de suspensions de bactéries lactiques, Fonseca et al. (2006) ont mis en évidence l'absence de formation de glace intracellulaire lors de la congélation, quelle que soit la vitesse de refroidissement appliquée.

En permettant une caractérisation du comportement physique des matrices, lors des procédés de congélation et lyophilisation, l'analyse enthalpique différentielle et la cellule de cryodessiccation constituent deux outils complémentaires d'aide au développement de la formulation protectrice et des paramètres opératoires associés. S'appuyant sur l'hypothèse, que la membrane bactérienne joue un rôle clé dans la survie des bactéries lactiques aux procédés de congélation et de lyophilisation, nous avons développé différentes méthodes pour obtenir une caractérisation approfondie des propriétés de la membrane:

- l'extraction accélérée par solvant, couplée à la chromatographie en phase gazeuse, pour déterminer la composition en acide gras (collaboration avec Caroline Pénicaud, CR équipe BioMiP),

- la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, associée à une cellule de refroidissement, pour déterminer la température de transition de phase des lipides membranaires (collaboration avec W. Wolkers et H. Oldenhof),

- l'anisotropie de fluorescence par cytométrie en flux pour déterminer la fluidité membranaire (collaboration avec Marielle Bouix, PR équipe BioMiP).

Depuis 2011, un partenariat étroit avec les chercheurs du synchrotron SOLEIL (lignes de lumière SMIS et DISCO), a été établi pour étudier à l'échelle de la cellule unique le comportement biophysique et biochimique des bactéries à la congélation et à la déshydratation.

II.2.2 La spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)

II.2.2.1. Caractérisation de l'évolution des propriétés de la membrane avec la température

Lors d'un séjour de 6 mois, au sein de l'UMR GMPA (2004), W. Wolkers et H. Oldenhof, nous ont permis de développer la mesure de transition de phase lipidique des membranes bactériennes, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IFTF ou FTIR en anglais), couplée à une cellule de contrôle en température de l'échantillon (**Figure 12A**) (Oldenhof et al., 2005). Un échantillon de suspension bactérienne est placé en sandwich entre deux fenêtres de CaF₂ et positionné dans la cellule de contrôle de température. L'échantillon est ensuite soumis à des cycles de refroidissement et de chauffage (de ~ -50 °C à 250 °C) et des spectres infrarouges sont enregistrés à une fréquence de ~ 2 °C/min. Un nombre important de spectres est donc obtenu et traité par un logiciel développé en interne (ASpIR, INRA, Thiverval-Grignon), pour identifier la position de bandes spécifiques et représenter l'évolution de la position du pic caractéristique de la bande d'intérêt avec la température.

Différentes bandes ont été analysées depuis 2004 (Gautier et al., 2013; Meneghel et al., 2017b; Oldenhof et al., 2005):

- la bande d'élongation symétrique des groupes CH₂ vers 2850 cm⁻¹ (ν CH₂ *sym.*), caractérisant les lipides membranaires (chaînes hydrocarbonées des phospholipides). Le passage de la membrane de la phase gel à la phase liquide cristalline, lors d'une augmentation de température (transition de phase lipidique), se traduit par une élévation de la fréquence de vibration de 2850 cm⁻¹ à 2856 cm⁻¹ (Crowe et al., 1989).

- la bande d'élongation asymétrique des groupes PO_2^- vers 1200 cm^{-1} (νPO_2^- *asym.*), caractérisant les groupements polaires des phospholipides membranaires. La position de cette bande permet de renseigner sur le niveau de participation des groupes polaires des phospholipides dans des liaisons hydrogène (Arrondo and Goni, 1998; Goni and Arrondo, 1986; Lewis and McElhaney, 1998). L'implication des groupements phosphate dans des liaisons hydrogène avec l'environnement se traduit par une diminution de la fréquence de cette vibration. Inversement, une augmentation de la fréquence de vibration est associée à un compactage des groupements phosphate des têtes polaires des phospholipides (Diaz et al., 2003; Frias et al., 2006).
- la bande de combinaison de libration et de flexion de l'eau dans la région spectrale $2250 - 2000\text{ cm}^{-1}$ (νH_2O). La cristallisation de l'eau lors du refroidissement est associée à une augmentation brutale de la fréquence de vibration.
- la bande d'absorption amide-I entre 1700 et 1600 cm^{-1} , caractéristique de la structure secondaire des protéines.
- la bande d'élongation des groupements OH vers 3300 cm^{-1} , permettant de caractériser la transition vitreuse pour des échantillons déshydratés (passage de l'état vitreux à l'état viscoélastique, lors du chauffage de l'échantillon).

La **Figure 12** illustre l'évolution de la position des bandes νCH_2 *sym.* (**Figure 12B**), νPO_2^- *asym.* et νH_2O (**Figure 12C**), lors du refroidissement de $50\text{ }^\circ\text{C}$ à $-50\text{ }^\circ\text{C}$ de suspensions bactériennes de deux souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgricus*, CFL1 (en vert) et ATCC 11842 (en rouge). Le refroidissement de l'échantillon entraîne un déplacement de la position de la bande νCH_2 *sym.*, caractérisant les chaînes d'acides gras des phospholipides membranaires, vers des fréquences plus faibles (de 2853 cm^{-1} vers 2850 cm^{-1}) (**Figure 12B**). Cette évolution définit la transition de phase des lipides membranaires d'une phase fluide désordonnée (phase liquide cristalline), vers une phase rigide ordonnée (phase gel), lors de l'abaissement de température. La température de transition de phase lipidique de la membrane bactérienne (T_s ou T_m) a été définie comme la température correspondant au maximum de la dérivée première de la courbe, représentant l'évolution de la position du pic caractéristique de la bande νCH_2 *sym.* avec la température. Sur la **Figure 12C**, est tracée l'évolution de la position de la bande νH_2O , permettant d'identifier la formation des cristaux de glace dans l'échantillon. La cristallisation de l'eau est identifiée par une augmentation brutale de la fréquence de vibration autour de $-10\text{ }^\circ\text{C}$. Pour les groupements PO_2^- , la diminution de la température entraîne une augmentation linéaire de la position de la bande jusqu'à la cristallisation de l'eau, suivie d'une diminution brutale de la fréquence. Puisque le comportement de la bande νPO_2^- *asym.* est directement affecté par l'événement de cristallisation de l'eau, la vibration des groupements PO_2^- peut être attribuée aux constituants bactériens, en contact direct avec l'environnement extracellulaire, les phospholipides membranaires et non les acides nucléiques ou d'autres molécules phosphorylées intracellulaires (Dianawati et al., 2012). Les deux populations bactériennes, cultivées dans les mêmes conditions, présentent donc une évolution différente des propriétés membranaires au cours de la congélation.

II.2.2.2. Caractérisation biochimique des populations bactériennes à l'échelle de la cellule unique

La spectroscopie IRTF est un outil analytique puissant, utilisé depuis cette dernière décennie pour caractériser la composition biochimique et le métabolisme cellulaire, en analysant l'empreinte spectrale des constituants biologiques comme les lipides, protéines, acides nucléiques, carbohydrates. En microbiologie, cette technique a démontré sa capacité à classifier et identifier des bactéries pathogènes alimentaires.

La combinaison de la microspectroscopie infrarouge et du rayonnement synchrotron a permis d'obtenir l'empreinte spectrale de bactéries uniques, à l'état déshydraté (Saulou et al., 2013; Saulou et al., 2010). Par ailleurs, l'utilisation de sondes fluorescentes (diacétate de carboxyfluorescéine (cFDA) et iodure de propidium (IP), (Rault et al., 2007)) a permis une caractérisation simultanée de l'état physiologique et de la composition biochimique d'une cellule bactérienne (**Figure 13**) (Passot et al., 2015). Un échantillon d'une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1, préalablement marquée avec le cFDA et l'IP, est déposé sur un hémisphère ATR en séléniure de zinc (ZnSe) puis mis à sécher dans une boîte balayée par un air sec. En raison de l'indice de réfraction du ZnSe (2,4), une résolution spatiale de 3,3 μm peut être atteinte, correspondant à la taille d'une cellule bactérienne. La **Figure 13** illustre un spectre infrarouge d'une bactérie viable (marquée par le cFDA, fluoresçant en vert) et un spectre infrarouge d'une bactérie non viable présentant une membrane endommagée (marquée par l'IP, fluoresçant en rouge).

Par ailleurs, dans le cadre d'une ANS financée par le département CEPIA, un dispositif expérimental a été développé permettant d'acquérir des spectres infrarouges de cellules uniques lors du procédé de déshydratation et de réhydratation. Ce dispositif permettant le contrôle de l'humidité relative et de la température a été appliqué, pour étudier les changements moléculaires induits lors du séchage de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (Nguyen et al., 2017).

Dans le cadre des travaux de thèse de Julie Meneghel, un dispositif unique d'acquisition de spectre infrarouge de cellules individuelles de *L. bulgaricus*, en milieux aqueux, a été conçu en collaboration avec les scientifiques de la ligne de lumière SMIS du synchrotron SOLEIL. La **Figure 14** présente une vue schématique du dispositif expérimental (**Figure 14B**), ainsi que des agrandissements des zones correspondant à l'objectif inversé et à la chambre de dépôt de l'échantillon liquide (**Figure 14C et 14D**). Le faisceau synchrotron est focalisé par un miroir parabolique à travers une ouverture ajustable, réglée à 128 x 128 μm^2 . Le faisceau est ensuite collimaté et réduit d'un facteur 32 à travers un objectif Schwartzschild (32x - NA 0,65). Finalement, un hémisphère ATR en germanium, de haut indice de réfraction (4,01), permet de réduire la taille du faisceau d'un facteur 4 environ. La face plane de l'hémisphère constitue le fond de la chambre de dépôt de l'échantillon liquide (**Figure 14D**) et l'étanchéité est assurée par un joint circulaire. La chambre peut être fermée pendant l'expérience. L'hémisphère et la chambre d'échantillon sont associés à une platine mobile et tous les composants optiques sont isolés dans une boîte en plexiglass, constamment balayée avec de l'air sec. En parallèle de ce travail, un protocole d'acquisition des spectres infrarouges d'une population bactérienne, en milieu aqueux, a été mis au point sur un microscope IRTF de laboratoire (**Figure 15**) associé à une micro-chambre démontable en CaF_2 (Hellma Analytics, Paris, France). Un fin film de mylar (2,5 μm d'épaisseur) est placé au centre de la micro-chambre, et des échantillons de la suspension

bactérienne et de la solution de dilution de cette dernière, sont déposés de part et d'autre du film de mylar. La micro-chambre est maintenue fermée, grâce à une platine porte-échantillon, faite sur mesure. Dans les deux configurations expérimentales, la cellule unique ou la population bactérienne, un programme Matlab a été développé pour soustraire la contribution de la vibration de l'eau au spectre infrarouge. La **Figure 16** illustre des spectres infrarouges, acquis sur une seule cellule ou plusieurs milliers, avant et après la soustraction de la contribution de l'eau.

II.2.3 L'anisotropie de fluorescence pour évaluer la fluidité membranaire

La fluidité membranaire joue un rôle primordial dans les événements biophysiques, ayant lieu lors de la congélation, en facilitant ou non les échanges entre les milieux intracellulaires et extracellulaires. La méthode, communément utilisée, pour quantifier la fluidité membranaire, repose sur la mesure de la polarisation de fluorescence d'une sonde insérée dans la bicouche lipidique, le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène ; excitation/emission : 350 nm/420 nm) ou le TMA-DPH (1-[4-(triméthyl-amino)phényl]-6-diphényl-1,3,5-hexatriène ; excitation/emission : 355 nm/430 nm), au moyen d'un spectrofluorimètre. Nous avons profité de l'expertise de l'équipe BioMiP, sur la technique de cytométrie en flux, pour réaliser la mesure sur un cytomètre en flux, et pouvoir ainsi combiner fluidité membranaire et état physiologique des bactéries (Bouix and Ghorbal, 2017).

Grâce à une étroite collaboration avec les scientifiques de la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL, un dispositif unique de mesure de la fluidité membranaire, à l'échelle de la cellule unique, sur une gamme de température de 0 °C à 30 °C, a été développé. Le microscope TELEMOS de la ligne DISCO a été modifié pour réaliser des mesures d'anisotropie de fluorescence (**Figure 17A**) (Passot et al., 2014b). Deux polariseurs linéaires ont été installés: un polariseur rotatif, sur le trajet de l'excitation, juste avant l'entrée dans le microscope, et un polariseur fixe, sur le trajet de l'émission, entre la sortie du microscope et la caméra. Un miroir un miroir dichroïque à 400 nm et un filtre passe bande 420-480 nm ont été également disposés sur le trajet optique. Des essais préliminaires ont été réalisés sur une lame test, pour déterminer la position du polariseur rotatif, correspondant à l'intensité maximale de fluorescence émise (I_{max}). En tournant le polariseur d'un angle de 90°, l'intensité minimale de fluorescence émise (I_{min}) est obtenue. Une platine de type Peltier a été installée, sous le microscope pour modifier et contrôler la température de l'échantillon. Les images de fluorescence sont enregistrées, après excitation de la sonde fluorescente à 340 nm. Après marquage des cellules, avec la sonde fluorescente TMA-DPH, environ 0,5 µL d'échantillon sont placés en sandwich entre deux lames de quartz et positionnés sur la platine Peltier. Les cellules sont observées avec un objectif 100X (**Figure 17B**), puis les images de fluorescence émise I_{max} et I_{min} sont enregistrées (**Figure 17C**). Le traitement des images est réalisé, en utilisant le logiciel ImageJ (1.49v, NIH, USA). L'image d'anisotropie de fluorescence (r) est calculée à partir des images de fluorescence émise I_{max} et I_{min} , en utilisant l'équation suivante:

$$r = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + 2 \times I_{min}}$$

Sur l'image d'anisotropie de fluorescence obtenue, les nuances de gris correspondent à la distribution des valeurs de fluidité membranaire au sein de la cellule. Pour faciliter la visualisation, les images d'anisotropie de fluorescence sont recolorées en utilisant l'analogie du feu disponible dans ImageJ (**Figure 17D**). L'anisotropie de fluorescence et la fluidité membranaire sont inversement proportionnelles. Une faible valeur d'anisotropie (r), représentée en violet sur l'image, indique une membrane fluide. Inversement, une forte valeur d'anisotropie, représentée en jaune sur l'image, indique une membrane rigide. A partir des images d'anisotropie de fluorescence, il est possible d'obtenir une cartographie cellulaire précise de la fluidité membranaire, d'identifier et de localiser la présence de domaines rigides au sein de la membrane (**Figure 17E**).

Conclusion

Au cours de ces dernières années, les développements méthodologiques ont été conséquents pour obtenir des informations à l'échelle de la bactérie et accéder ainsi, à une caractérisation approfondie du comportement physique, biochimique et physiologique des bactéries, au cours des procédés de stabilisation (congélation et lyophilisation). Les données obtenues, par l'analyse enthalpique différentielle et la spectroscopie IRTF, ont permis de reconstruire les événements physiques subits par une cellule bactérienne lors de la congélation (Fonseca et al., 2016). La **Figure 18** représente, de façon schématique, les différentes transitions physiques ayant lieu au cours de la congélation d'une cellule de *L. bulgaricus* CFL1, cultivée en milieu lactosérum et protégée avec du glycérol. La cellule subit, en premier lieu, la rigidification de sa membrane plasmique vers 9 °C, avec le passage de la transition de phase lipidique. Puis vers -5°C, les premiers cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire, entraînant sa cryoconcentration, et la cellule commence à se déshydrater jusqu'à -33 °C, la transition vitreuse intracellulaire où le milieu intracellulaire se fige à l'état vitreux. Parallèlement, les cristaux de glace grossissent dans le milieu extracellulaire jusqu'à -99 °C, la transition vitreuse extracellulaire où l'ensemble de l'échantillon vitrifie.

Ces méthodes de caractérisation ont été mises en œuvre, pour identifier les propriétés physiques et les constituants cellulaires jouant un rôle clés dans la résistance des bactéries lactiques aux procédés de stabilisation et améliorer ainsi nos connaissances sur les mécanismes de dégradation et de préservation des fonctionnalités biologiques.

II.3. COMPREHENSION DES MECANISMES DE DEGRADATION ET DE PROTECTION DES FONCTIONNALITES BIOLOGIQUES

Nos travaux, sur la compréhension des mécanismes de dégradation et de protection des fonctionnalités biologiques, se sont appuyés sur les méthodes de caractérisation, décrites dans le chapitre précédent, et sur deux démarches d'étude:

- la modification des conditions de formulation, avec notamment l'ajout de molécules protectrices, et de conduite du procédé de lyophilisation, pour identifier les propriétés physiques clés de la matrice,
- la modification des conditions de fermentation des bactéries lactiques, pour créer des "structures cellulaires" différentes et identifier ainsi des marqueurs cellulaires de résistance aux procédés de congélation et de lyophilisation.

II.3.1 Modification des conditions de formulation et de conduite du procédé

II.3.1.1. Effet du maintien à l'état vitreux sur la stabilité des fonctionnalités biologiques

D'après Levine and Slade (1986, 1988), la température de transition vitreuse du matériau est un paramètre important pour assurer la stabilité d'une fonctionnalité biologique. Le maintien du produit à l'état vitreux constitue une condition nécessaire à la stabilité, puisque l'augmentation de la mobilité moléculaire associée au passage à l'état viscoélastique entraîne une augmentation des constantes de vitesse des réactions de dégradation contrôlées par la diffusion (Pikal, 1999). L'état vitreux est impliqué, non seulement lors du stockage d'un produit lyophilisé, mais également au cours des différentes étapes du procédé de lyophilisation. Ces études ont été menées dans le cadre des projets européens LYOPRO, sur la lyophilisation de protéines pharmaceutiques, et CAFE, sur la lyophilisation de bactéries lactiques.

➤ Etude la stabilité au cours du stockage à l'état lyophilisé

Des échantillons lyophilisés de protéines pharmaceutiques (toxines A et B de *Clostridium difficile*) et de suspensions bactériennes (*Lb. bulgaricus* CFL1) ont été équilibrés à différentes valeurs d'activité de l'eau et stockés à 25 °C. La teneur en eau, l'activité de l'eau, la température de transition vitreuse et l'activité de la fonctionnalité ont été évaluées. Ces quatre propriétés ont été mises en relation sur les diagrammes présentés sur la **Figure 19**. La ligne rouge indique la valeur d'activité de l'eau correspondant à l'égalité entre la température de stockage (25 °C) et la température de transition vitreuse du matériau. Elle sépare les domaines de l'état vitreux, à la mobilité moléculaire fortement réduite, et de l'état viscoélastiques, à la mobilité moléculaire augmentée. Lorsque les échantillons sont conservés à l'état viscoélastique, une perte d'activité antigénique des toxines A et B (**Figure 19A**) et une augmentation de la perte d'activité acidifiante de *L. bulgaricus* CFL1 (**Figure 19B**) sont observées. Le maintien de l'état vitreux, au cours du stockage, apparaît donc nécessaire pour assurer la stabilité, à long terme, des fonctionnalités biologiques (Passot et al., 2012b; Passot et al., 2006).

➤ Etude de l'effet de l'histoire thermique du produit, au cours de l'étape de sublimation, sur la stabilité au stockage des fonctionnalités biologiques

La température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum (T_g') et la température d'effondrement (T_{coll}) représentent deux propriétés essentielles, pour déterminer la valeur critique de la température du produit, à ne pas dépasser, lors de l'étape de sublimation, et les conditions opératoires associées (température étagère et pression). Ces deux propriétés (T_g' et T_{coll}) peuvent être très différentes, selon les matériaux biologiques considérés. Ainsi pour des protéines à usage pharmaceutique, elles diffèrent, selon la nature de l'agent de charge utilisé (cristallin ou amorphe) (Passot et al., 2005; Passot et al., 2007), et dans le cas des bactéries lactiques, selon la concentration en cellules (Fonseca et al., 2004a).

Pendant l'étape de sublimation, le maintien de la température du produit, en dessous de la température d'effondrement, permet de préserver, non seulement la structure physique des produits lyophilisés, mais également, dans le cas des bactéries lactiques, leur activité acidifiante (**Tableau 5**). En revanche, dans le cas des protéines pharmaceutiques étudiées, c'est le maintien de la température du produit, en dessous de la température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée (T_g'), qui permet d'assurer la stabilité à long terme de l'activité antigénique des toxines (**Figure 20**). Ainsi, pour les deux formulations étudiées, l'une à caractère amorphe (PS, **Figure 20A**) et l'autre à caractère cristallin (MnP, **Figure 20B**), la perte d'activité antigénique des protéines, stockées à 4 °C, augmente significativement dès que la température du produit, pendant la sublimation, excède la température de transition vitreuse T_g' . Le passage à l'état viscoélastique de la matrice incluant le principe actif est associé à une mobilité moléculaire accrue, susceptible d'entraîner le dépliement de la protéine. La protéine, à l'état déplié, est plus sensible aux réactions de dégradation, pouvant intervenir au cours du stockage (Passot et al., 2007).

II.3.1.2. Mécanismes d'action des molécules protectrices

En 2001, l'UMR GMPA a déposé un brevet sur un procédé de préparation d'une composition lyophilisée, contenant des bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées, lors d'un stockage à température ambiante (Beal et al., 2001). Le brevet définit une composition de formulation protectrice, basée sur une approche rationnelle de la préservation de la fonctionnalité et de la conduite du procédé. La formulation proposée combine: *i*) un polysaccharide, pour élever la température de transition vitreuse du milieu protecteur, et de ce fait pour maintenir le concentré bactérien, à l'état vitreux, pendant le stockage à température ambiante; *ii*) un disaccharide, pour limiter les dommages dus à la rupture des liaisons hydrogène, lors de l'élimination de l'eau non congelée et *iii*) un antioxydant, pour limiter les réactions de dégradation par oxydation lors du stockage. Les molécules protectrices identifiées ont été appliquées à la préservation d'autres objets (toxines A et B de *Clostridium difficile*, microsphères protéiques d' α -lactalbumine et de lysozyme, *L. bulgaricus* CFL1), afin d'identifier leurs mécanismes d'action.

➤ Le rôle protecteur primordial des disaccharides

Dans la littérature, deux mécanismes d'action des molécules sont largement rapportés, pour expliquer la protection des fonctionnalités biologiques lors du procédé de lyophilisation: *i*) l'immobilisation du principe actif dans une matrice vitreuse, et *ii*) le remplacement des molécules d'eau, avec l'établissement de liaisons hydrogène entre la molécule protectrice et le principe actif, lors de l'élimination de l'eau non congelable pendant l'étape de désorption.

Lors du séjour de W. Wolkers et H. Oldenhof à l'UMR GMPA, l'application de ces deux hypothèses à la protection de bactéries lactiques a été étudiée. Le comportement de liposomes de POPC¹¹ et d'une protéine (poly-L-lysine), déshydratés en présence de saccharose et de maltodextrine, a été analysé par spectroscopie IRTF (**Figure 21**) (Oldenhof et al., 2005). A l'état hydraté, les liposomes de POPC présentent une température de transition de phase lipidique (T_m) de 0 °C, qui augmente à 68 °C à l'état déshydraté, en l'absence de protecteur. Les liposomes de POPC déshydratés, en présence de saccharose ou de maltodextrine, sont caractérisés par des valeurs très différentes de T_m , -21 °C pour le saccharose, et 64 °C pour la maltodextrine. La déshydratation des liposomes, en présence de mélanges de saccharose et de maltodextrine, aboutit à des valeurs intermédiaires de T_m , indiquant que seul le saccharose a la capacité de diminuer la température de transition de phase lipidique des liposomes déshydratés, à une valeur proche de leur état hydraté (**Figure 21A**). L'examen de la bande d'élongation asymétrique des groupements phosphate du spectre infrarouge a permis de mettre en évidence que le saccharose, à l'inverse de la maltodextrine, interagit avec les groupements polaires des phospholipides, et peut donc établir des liaisons hydrogène lors du procédé de déshydratation. Parallèlement, la déshydratation de la protéine modèle (poly-L-lysine), en l'absence de protecteur ou en présence de maltodextrine, entraîne la formation de structure de type feuillet- β , caractéristique de la dénaturation et de l'agrégation des protéines (**Figure 21B**). L'ajout de saccharose permet le maintien de la protéine, dans sa conformation native, ce qui indiquerait la formation de liaison hydrogène entre la protéine et le saccharose. Cette étude a permis de mettre en évidence le mode d'action spécifique du saccharose, pour la protection des membranes et des protéines lors du procédé de déshydratation.

Dans le cadre du projet ANR LacLys, les propriétés protectrices du saccharose et de la maltodextrine ont été également évaluées, lors des différentes étapes du procédé de lyophilisation de microsphères protéiques, créées par l'assemblage contrôlé de molécules de α -lactalbumine et de lysozyme (Desfougères et al., 2010; Nigen et al., 2009; Nigen et al., 2010). Des prélèvements d'échantillons ont été réalisés, au cours du cycle de lyophilisation, et la taille et le nombre de microsphères ont été évalués par compteur Coulter® ou analyse d'image (**Figure 22**). L'ajout de ces deux molécules a permis de limiter la formation d'agrégats de microsphères, lors de l'étape de congélation, ce qui laisserait envisager d'autres mécanismes d'action de ces molécules spécifiques à cette étape (Passot et al., 2011a).

Dans le cadre du projet européen LYOPRO et de mes travaux de thèse, une gamme plus importante de molécules protectrices a été étudiée, molécules utilisées seules ou en association : acide aminé (glycine),

¹¹ POPC : 1-palmitoyl 2-oleoyl phosphatidyl choline (phosphatidylcholine mono-insaturé)

polyols (mannitol, polyéthylène glycol), polymères (maltodextrine, polyvinylpyrrolidone (PVP)), disaccharide (saccharose) (Passot et al., 2005). La **Figure 23** illustre l'effet des différentes molécules protectrices, sur la stabilité des toxines A et B de *Clostridium difficile*, après 6 mois de stockage à 25 °C à l'état lyophilisé. Les résultats obtenus pour la glycine, le mannitol, la maltodextrine et le saccharose apparaissent en accord avec les mécanismes de protection rapportés dans la littérature. La caractérisation physique, par analyse thermique différentielle des formulations à l'état congelé et déshydraté, a mis en évidence la présence de la glycine et du mannitol sous forme cristalline, ce qui rend impossible les deux mécanismes d'action énoncés, l'immobilisation au sein d'une matrice vitreuse et la formation de liaisons hydrogène, et explique donc les faibles valeurs d'activité antigénique récupérée (< 50 %). La moindre performance de la maltodextrine (60 %), par rapport au saccharose (90 %), peut être attribuée à la taille plus importante de la molécule de maltodextrine, qui limiterait l'établissement des liaisons hydrogène avec les toxines. Cependant, les bonnes performances observées pour le polyéthylène glycol, présent à l'état cristallin, et la PVP, de masse moléculaire nettement supérieure au saccharose (25 kDa) semblent indiquer d'autres mécanismes d'action des molécules, notamment lors des étapes de congélation et de réhydratation.

➤ Phénomène d'oxydation lors du procédé de lyophilisation

(Fonseca et al., 2003a) ont mis en évidence l'effet bénéfique de l'ajout d'une molécule antioxydante, l'ascorbate de sodium, pour conserver des suspensions bactériennes de *L. bulgaricus* CFL1 à l'état congelé à -20 °C. Le rôle protecteur de cette molécule a été observé lors de l'étape d'attente avant congélation et lors du stockage. Dans le cadre du projet européen CAFE, les pertes d'activité acidifiante (dtm) de *L. bulgaricus* CFL1 ont été évaluées, après les différentes étapes du procédé de lyophilisation: congélation, sublimation, désorption et 3 mois de stockage à 25 °C. Trois formulations protectrices ont été étudiées: *i*) saccharose (200 g/L), *ii*) ascorbate de sodium (10 g/L) et *iii*) un mélange saccharose et ascorbate de sodium (**Figure 24**). L'activité acidifiante des bactéries a été déterminée en utilisant la méthode CINAC (Fonseca et al., 2000). Cette méthode est basée sur la mesure du temps (tm, en min), nécessaire à une culture bactérienne réalisée en conditions standardisées, pour atteindre la vitesse maximale d'acidification dans du lait. Toute dégradation de l'activité biologique des bactéries se traduit par une augmentation de la valeur de tm. La perte d'activité acidifiante (dtm, en min) est donc définie comme la différence entre les valeurs de tm mesurées pour deux étapes successives du procédé selon l'équation suivante:

$$dtm = tm_{i+1} - tm_i$$

avec i et i+1, deux étapes successives du procédé.

Par exemple, la perte d'activité acidifiante aux étapes de congélation et de sublimation est décrite par les équations suivantes:

$$dtm_{\text{congélation}} = tm_{\text{après congélation}} - tm_{\text{avant congélation}}$$

$$dtm_{\text{sublimation}} = tm_{\text{après sublimation}} - tm_{\text{après congélation}}$$

La comparaison des résultats obtenus pour le saccharose et l'antioxydant, utilisés seuls, révèle l'effet protecteur très important de l'antioxydant, lors de l'étape de stockage à l'état déshydraté avec une perte d'activité acidifiante 2,5 fois moindre, que celle observée dans le cas du saccharose. Le saccharose présente un effet protecteur lors des étapes de congélation et sublimation. Par ailleurs, un effet protecteur synergique, entre le saccharose et l'antioxydant, est observé lors du procédé de lyophilisation, ce qui met clairement en évidence l'importance des phénomènes d'oxydation, non seulement lors du stockage, mais également lors du procédé de lyophilisation, phénomènes qui restent à élucider.

Afin d'étudier les phénomènes d'oxydation, une collaboration a été établie avec l'équipe de recherche de Clotilde Policar (Professeure à l'ENS-Ulm, UMR 7203 Peptides, Glycoconjugués et Métaux en Biologie). Dans les organismes procaryotes, en complément d'enzyme endogène, de petits complexes de manganèse Mn(II) ont été identifiés comme système de défense majeur contre l'oxydation (Horsburgh et al., 2002). Par exemple, des bactéries comme *Lactobacillus plantarum* accumule de fortes teneurs en manganèse (30 mM). *Deinococcus radiodurans*, une bactérie végétative extrêmement résistante aux radiations ionisantes, est particulièrement riche en Mn (200 µM) et cette richesse en Mn a été associée à sa résistance aux stress (Daly et al., 2010; Slade and Radman, 2011). L'équipe de Clotilde Policar a développé des complexes Mn(II), présentant une activité anti-superoxyde *in vitro* (Cisnetti et al., 2007a; Cisnetti et al., 2007b) et sur des macrophages en culture (Bernard et al., 2012). Des expériences préliminaires ont été réalisées pour tester l'efficacité *in vivo* de ce complexe sur des bactéries lactiques (*L. bulgaricus* CFL1). L'addition d'une concentration de 50 mM du complexe Mn(II), dans le milieu de fermentation, induit une augmentation significative de la résistance des bactéries lactiques au procédé de lyophilisation. Ces résultats préliminaires confirment l'occurrence d'un stress oxydatif au cours du procédé même de lyophilisation. Suite à ces résultats prometteurs, nous avons déposé un projet ANR, pour poursuivre nos études sur la compréhension des phénomènes d'oxydation lors du procédé de lyophilisation des bactéries lactiques, projet malheureusement, non retenu, par l'ANR.

II.3.2 Modification des conditions de fermentation

II.3.2.1. Une membrane fluide ou rigide, pour améliorer la résistance aux stress des procédés de lyophilisation et de congélation ?

La membrane cytoplasmique est la cible principale de dégradation cellulaire, lors des procédés de stabilisation. Elle joue un rôle important dans la résistance des cellules, comme en témoignent les travaux établissant un lien entre sa composition en acides gras et la réponse des cellules aux stress environnementaux (Beney and Gervais, 2001; Son et al., 2005; Wu et al., 2012). Un lien, entre la composition membranaire et ses propriétés de fluidité, est généralement avancé, mais une caractérisation approfondie des propriétés de la membrane fait souvent défaut. Pour pallier à ce manque, nous avons généré des populations bactériennes présentant des états cellulaires (compositions en acides gras membranaires) et des résistances aux procédés de stabilisation différentes, en modulant les conditions de fermentation (milieu de culture, temps de fermentation, etc.). Une caractérisation approfondie des propriétés biochimiques et biophysiques des

populations bactériennes générées, à l'échelle de la population et de la cellule unique, a été réalisée pour pouvoir identifier des marqueurs cellulaires de résistance aux stress induits par les procédés de stabilisation. C'est dans ce contexte que se sont effectués les travaux de thèse d' Héléne Velly, Julie Gautier et Julie Meneghel (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Récapitulatif des objets d'étude et des méthodes analytiques appliquées lors des travaux de thèse de H. Velly, J. Gautier et J. Meneghel

	THESE H. VELLY	THESE J. GAUTIER	THESE J. MENEGHEL
Bactérie	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> TOMSC 161	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CFL1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CFL1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842
Procédé de stabilisation	Lyophilisation	Congélation	Congélation Exposition aux stress froid et osmotique
Paramètres de fermentation	Temps de récolte Température	Milieu de culture	Souche
METHODES DE CARACTERISATION BIOCHIMIQUES ET BIOPHYSIQUES			
Composition en acide gras	X	X	X
Spectroscopie IRTF	X	X	X
Fluidité membranaire	X	X	X
Déshydratation cellulaire		X	
Synchrotron SOLEIL Ligne SMIS		X	X
Synchrotron SOLEIL Ligne DISCO		X	X
Analyse protéomique et transcriptomique	X		
Articles publiés	(Velly et al., 2015)	(Gautier et al., 2013) (Passot et al., 2014b) (Passot et al., 2015)	(Meneghel et al., 2017b) (Meneghel et al., 2017a)

Ligne SMIS : microspectroscopie IRTF / Ligne DISCO : cartographie cellulaire de la fluidité membranaire / Déshydratation cellulaire estimée à partir des mesures de volume cellulaire par compteur Coulter®.

La **Figure 25** illustre l'évolution des propriétés de la membrane bactérienne au cours de la fermentation et leurs liens avec la perte d'activité acidifiante de *L. lactis* observée après le procédé de lyophilisation et après 3 mois de stockage à 25 °C (Velly et al., 2015). L'augmentation du temps de fermentation, notamment de la durée de la phase stationnaire, s'accompagne d'un changement de la composition en acides gras membranaires avec une augmentation du ratio acides gras cycliques (CFA) sur acides gras insaturés (UFA), associée à la cyclopropanation des acides gras insaturés. Cette augmentation du ratio CFA:UFA apparaît nettement corrélée à une rigidification de la membrane (augmentation de la valeur

d'anisotropie, r) et une amélioration de la résistance de *L. lactis* à la lyophilisation et au stockage (diminution des pertes d'activité acidifiante, d_{tspe}).

Dans le cas des travaux sur *L. bulgaricus*, des résultats différents ont été obtenus (**Tableau 7**). La membrane de *L. bulgaricus* contient relativement peu d'acides gras cycliques, la teneur maximale obtenue est de 14 % à partir d'un milieu de culture riche (MRS). La résistance à la congélation est corrélée à une augmentation de la teneur en acides gras insaturés, entraînant une augmentation de la fluidité membranaire (diminution de r). La **Figure 26** illustre le comportement biophysique des membranes de *L. bulgaricus* CFL1, cultivé dans deux milieux différents (MRS = cellules résistantes représentées en violet et Whey (lactosérum) = cellules sensibles représentées en orange à la congélation) lors d'un procédé de congélation ou refroidissement (Gautier et al., 2013; Passot et al., 2012a; Passot et al., 2014b). Des valeurs, très proches de perméabilité à l'eau de la membrane, ont été déterminées pour les deux populations bactériennes indiquant un niveau similaire de déshydratation cellulaire atteint lors d'une congélation à 2 °C/min (**Figure 26A**). En revanche, l'évolution de la fluidité membranaire, avec la température, apparaît nettement différente pour les deux populations bactériennes. La population, résistante à la congélation, présente une faible valeur de température de transition de phase lipidique ($T_m = -5$ °C) et une membrane plus fluide à 5 °C ($r = 0,129$) que les cellules sensibles ($T_m = 37$ °C et $r = 0,233$) (**Figure 26B**). Par ailleurs, les cartographies cellulaires de fluidité membranaire, obtenues sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL, ont permis de mettre en évidence une homogénéité au sein des cellules résistantes et une forte hétérogénéité au sein des cellules sensibles, avec l'apparition de domaines membranaires rigides au sein de la membrane lors du refroidissement à 0 °C (**Figure 26C**). La membrane des cellules cultivées en MRS ("résistantes") est donc plus fluide, lorsque la cristallisation de l'eau et la déshydratation cellulaire associée à la cryoconcentration du milieu extracellulaire ont lieu, que les cellules cultivées en milieu lactosérum (Whey "sensibles"). Nous avons émis l'hypothèse qu'une fluidité membranaire plus importante faciliterait le départ de l'eau de la cellule et la réduction associée du volume cellulaire. Inversement, les membranes des cellules sensibles "plus rigides" et "hétérogènes" seraient soumises à d'importantes contraintes mécaniques, lors du départ de l'eau de la cellule, pouvant entraîner des phénomènes de rupture et de perte d'intégrité membranaire.

Pour aller plus loin dans la compréhension du comportement biophysique des membranes bactériennes, lors de la congélation, et de l'influence de la composition en acides gras membranaires sur ce comportement, le procédé de congélation a été représenté comme une combinaison d'un stress froid et d'un stress osmotique (thèse J. Meneghel). Le stress osmotique a été identifié comme le stress le plus délétère sur l'activité acidifiante et la cultivabilité des bactéries sensibles à la congélation (*L. bulgaricus* CFL1 cultivé en milieu lactosérum). L'évolution des propriétés biophysiques des membranes, des deux populations bactériennes soumises à un stress froid et/ou osmotique, a été caractérisée en détail, non seulement à l'échelle de la population (**Figure 27**), mais également à l'échelle de la cellule unique (**Figure 28**).

La **Figure 27** représente de façon schématique le comportement des cellules bactériennes et l'évolution des propriétés membranaires lors des changements environnementaux induits par le procédé de congélation (Meneghel et al., 2017b). La **Figure 27A** illustre l'évolution de la température et de l'osmolarité

de l'échantillon, de la fin de l'étape de fermentation à la décongélation pour les suspensions bactériennes de *L. bulgaricus* CFL1 (représenté en vert, souche sensible) et ATCC 11842 (représenté en rouge, souche résistante). Les principaux événements physiques, ayant lieu au sein de l'échantillon (transition de phase lipidique (Ts), cristallisation de l'eau (Tn), transitions vitreuses intra- et extra-cellulaires (Tg'i et Tg'e)), ainsi qu'une représentation schématique de l'état des cellules sont également représentés. L'évolution des propriétés biophysiques de la membrane est illustrée sur la **Figure 27B**, pour la partie hydrophobe centrale de la bicouche lipidique (chaînes carbonées des acides gras), et sur la **Figure 27C** pour la partie externe en contact avec la matrice extracellulaire (têtes polaires des phospholipides). L'évolution des propriétés est exprimée en pourcentage de variation, par rapport aux valeurs obtenues en fin de fermentation (42 °C, 300 mOsm). Une variation négative de la valeur d'anisotropie (r , DPH, TMA-DPH) indique une diminution de la fluidité membrane (ou rigidification de la membrane). Une variation négative des paramètres infrarouges, $\nu CH_2 \text{ sym.}$ et $\nu PO_2^- \text{ asym.}$, indique un déplacement de la vibration vers des fréquences plus faibles, ce qui représente, respectivement, une compaction des chaînes acyl des acides gras ($\nu CH_2 \text{ sym.}$) et une implication des têtes polaires des phospholipides dans des liaisons hydrogène ($\nu PO_2^- \text{ asym.}$). Pour la première fois, nous avons mis en évidence que l'organisation des groupements polaires des phospholipides membranaires, et notamment la modification induite par un stress osmotique, joue un rôle clé dans la résistance à la congélation de *L. bulgaricus*. Dans le cas de la souche CFL1, présentant des pertes importantes d'activité acidifiante à la congélation, nous avons émis l'hypothèse de la mise en place d'interactions directes entre le saccharose et les têtes polaires des phospholipides, lors de cryoconcentration en solutés, interaction susceptible d'altérer l'intégrité membranaire. Les résultats de cartographie cellulaire de la fluidité membranaire (**Figure 28**) ont rejoint cette hypothèse (Meneghel et al., 2017a). L'application d'un stress osmotique, aux cellules bactériennes sensibles (CFL1 en vert), entraîne l'augmentation du nombre de domaines rigides au sein de la membrane et un élargissement de ces domaines. Cet élargissement pourrait être attribué à l'interaction directe entre le saccharose et la membrane aboutissant à sa désorganisation.

Une caractérisation approfondie des propriétés biochimiques et biophysiques des membranes bactériennes et de leur évolution, au cours du procédé, apparaît donc primordiale pour comprendre les mécanismes cellulaires de dégradation et de résistance aux procédés de stabilisation. Cependant, lors de ces différents travaux, d'autres composants cellulaires ont été identifiés, comme pouvant jouer un rôle clé dans la résistance des bactéries lactiques.

II.3.2.2. Rôle des autres composants cellulaires dans la résistance des cellules bactériennes

Dans le cadre de la thèse de J. Gautier, et de notre collaboration avec la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL, des spectres infrarouges de bactéries individuelles déshydratées, issues de culture de *L. bulgaricus* CFL1 en milieu MRS (générant des bactéries résistantes à la congélation) et en milieu lactosérum (générant des bactéries sensibles) ont été enregistrés (Passot et al., 2015). Une analyse multivariée des données a permis de mettre en évidence que les cellules résistantes à la congélation se différencient des cellules sensibles, par trois caractéristiques biochimiques :

- une teneur plus élevée en groupements CH₃ des chaînes lipidiques,
- une teneur plus élevée en polymères chargés, tels que les acides téichoïques et lipotéichoïques caractéristiques de la paroi des bactéries Gram-positives,
- des protéines cellulaires caractérisées par des structures secondaires de type hélice α .

La paroi et les protéines intracellulaires semblent donc jouer un rôle dans la résistance des bactéries lactiques au procédé de congélation, rôle qui reste à quantifier et à expliciter.

CONCLUSION:

Nos travaux, sur la modulation des conditions de formulation et de conduite du procédé, nous ont permis d'identifier des propriétés clés de la matrice, pour la lyophilisation de fonctionnalités biologiques :

- l'histoire thermique du produit, et notamment le maintien de l'état vitreux lors du stockage à l'état déshydraté,
- la présence d'un disaccharide, assurant une protection lors du processus de déshydratation, par établissement de liaisons hydrogène avec les constituants biologiques, comme les protéines et les composants polaires de la membrane cytoplasmique,
- la présence d'une molécule antioxydante, permettant de limiter les phénomènes d'oxydation, ayant lieu lors du procédé de lyophilisation et du stockage.

Nos travaux sur la modulation des conditions de fermentation, ont confirmé le rôle primordial de la membrane cytoplasmique, pour la résistance des bactéries aux procédés de congélation et de lyophilisation. Ils ont également mis en lumière le rôle d'autres constituants cellulaires, comme les protéines cellulaires et la paroi bactérienne. Selon le procédé de stabilisation considéré, la propriété de fluidité membranaire influencerait, de façon opposée, la résistance bactérienne aux procédés. Une diminution de la fluidité membranaire semble être favorable pour le procédé de lyophilisation, alors qu'une augmentation de la fluidité membranaire améliore la fonctionnalité bactérienne après congélation.

En décomposant le procédé de congélation, en une combinaison de différents stress environnementaux et, en associant différentes méthodes analytiques, nous avons réussi à reconstruire le comportement biophysique des deux constituants principaux de la bicouche lipidique membranaire, les chaînes carbonées des acides gras et les têtes polaires des phospholipides, lors du procédé de congélation. Des travaux ont été initiés pour améliorer nos connaissances sur la nature des groupements polaires des phospholipides, en collaboration avec Y. Gohon, Maître de Conférences AgroParisTech, de l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB, Versailles).

II.4. CONCEPTION D'OUTILS D'AIDE A LA FORMULATION ET A LA CONDUITE DU PROCÉDE DE LYOPHILISATION

Nos travaux sur le développement de méthodes de caractérisation, et l'identification de paramètres clés, gouvernant la stabilisation des fonctionnalités biologiques, nous ont naturellement amenés à proposer des démarches rationnelles, pour développer des formules protectrices et des cycles de lyophilisation. Des partenariats industriels, d'une grande richesse, nous ont permis de valider et de généraliser nos outils sur d'autres micro-organismes. Depuis 2004, nous avons établi une collaboration avec l'équipe MALICES de l'UMR (Intégration des connaissances, Modélisation et analyse des systèmes alimentaires et biologiques complexes), pour intégrer des outils de modélisation à nos approches. Cette collaboration nous a permis non seulement de développer des outils d'aide à la conduite du procédé de lyophilisation, mais aussi d'améliorer nos connaissances sur les phénomènes de transfert de chaleur et de matière, ayant lieu lors des étapes de déshydratation.

II.4.1 Deux leviers d'action pour améliorer le procédé de lyophilisation: la formulation et la conduite du procédé

II.4.1.1. La rationalisation de la formulation protectrice

L'analyse enthalpique différentielle (AED) et la microscopie optique, associée à une cellule de cryodessiccation, se sont révélées comme des outils complémentaires d'aide au développement de formulations protectrices, et à la définition des paramètres critiques pour la conduite du procédé, comme la vitesse de congélation ou la valeur critique de température du produit, à ne pas dépasser lors de l'étape de sublimation.

L'analyse enthalpique différentielle permet de définir le protocole de congélation à appliquer, notamment pour assurer la cristallisation complète d'un agent de charge cristallin, largement utilisé dans les formulations pharmaceutiques (**Figure 29**). Pour une formulation à base de mannitol, seule l'application d'un traitement de recuit à -20 °C (ou annealing) permet d'atteindre sa cristallisation complète.

Dans le cas de milieux biologiques comportant des bactéries lactiques, nous avons montré, que les cellules bactériennes confèrent une résistance mécanique au produit lors de la sublimation de la glace. La température d'effondrement (T_{coll}), déterminée par observation microscopique dans la cellule de cryodessiccation, est alors nettement supérieure à la température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée (T_g'), déterminée par AED. L'influence de la concentration en cellules et de la forme des bactéries, sur ces deux propriétés physiques, a été étudiée (Fonseca et al., 2004b). Une augmentation de la concentration cellulaire dans l'échantillon entraîne une augmentation de la température d'effondrement. Des relations linéaires ont pu être établies entre la température d'effondrement et la teneur en matière sèche de la suspension bactérienne. D'un point de vue pratique, puisque toute augmentation de la température du produit, lors de l'étape de sublimation, permet une diminution significative de la durée du cycle de

lyophilisation, il devient alors intéressant, de maximiser la concentration en cellules dans la formulation. Cependant, pour assurer une bonne stabilité de la fonctionnalité biologique, la concentration en molécules protectrices, comme un disaccharide, est également un élément à définir. La **Figure 30** illustre l'influence du ratio, concentration en saccharose sur concentration en cellule bactérienne, sur la perte d'activité acidifiante, après 3 mois de stockage à 25 °C. Une valeur optimale du ratio « protecteur : cellule » est observée. L'augmentation de la perte d'activité acidifiante a été attribuée, soit à un stress osmotique, pour les valeurs élevées de ratio, soit à un nombre insuffisant de molécules protectrices pour l'établissement des liaisons hydrogène avec les membranes bactériennes, pour les faibles valeurs de ratio.

Suite à nos différents travaux, un squelette type de composition de formulation protectrice, applicable pour différents types de fonctionnalité biologique, a été proposé (**Figure 31**).

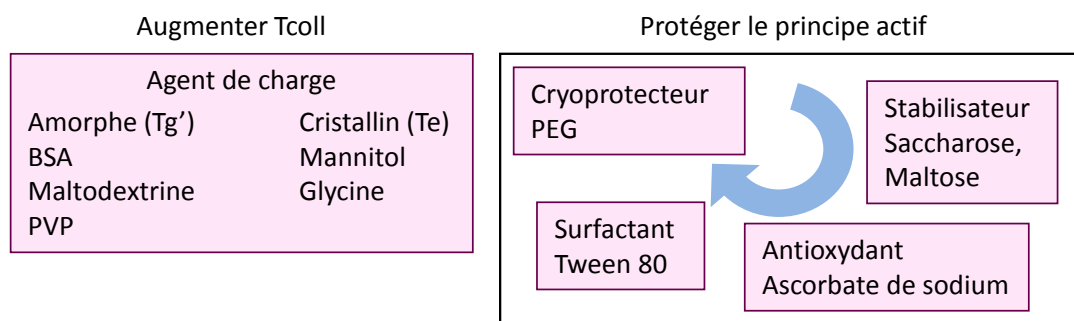


Figure 31 : Proposition d'une composition type pour l'établissement d'une formulation protectrice pour la lyophilisation d'un principe actif (protéine ou bactérie lactique)

Ce squelette repose sur la combinaison de deux types de molécules :

- des molécules de type agent de charge, permettant d'augmenter la température d'effondrement (Tcoll) et ainsi, la productivité et la robustesse du cycle de lyophilisation,
- des molécules, assurant la protection du principe actif, avec notamment un disaccharide, capable d'établir des liaisons hydrogène et d'immobiliser le principe actif dans une phase vitreuse, et un antioxydant pour limiter les réactions d'oxydation lors du stockage. Dans certains cas, l'ajout de molécules présentant des propriétés amphiphiles, peut être nécessaire, pour protéger le principe actif des stress mécaniques générés par son adsorption aux interfaces, cristaux de glace, parois du flacon, lors des étapes de congélation et de réhydratation.

II.4.1.2. Influence du mode de conduite de l'étape de congélation sur la stabilité des fonctionnalités biologiques et la productivité du procédé de lyophilisation

L'étape de congélation, étape la plus courte du procédé de lyophilisation fait l'objet d'un nombre limité de publication scientifique. Cependant, il s'agit d'une étape clé, gouvernant, par l'intermédiaire de la morphologie des cristaux de glace formés, la durée des deux étapes de dessiccation et la qualité du produit. Différents protocoles de congélation, aboutissant à différentes tailles de cristaux de glace, ont été appliqués à

une protéine modèle (catalase ou lactate déshydrogénase), et à une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1 (Fonseca et al., 2008; Passot et al., 2014a; Passot et al., 2009). Ces études ont montré, que les protocoles, maximisant la taille des cristaux de glace, induisent les pertes minimales d'activité biologique au cours de la lyophilisation et du stockage à 25°C.

L'association de deux capteurs de pression, un manomètre capacitif et une jauge Pirani, permet de déterminer la fin de l'étape de sublimation, et d'évaluer l'homogénéité des débits de sublimation pour un lot de flacons (**Figure 32**). Le manomètre capacitif indique la pression absolue de la chambre de lyophilisation, et la valeur indiquée reste donc constante lors de l'étape de sublimation. En revanche, la mesure de pression par la jauge Pirani, étalonnée en présence d'azote sec, est dépendante de la composition gazeuse de l'enceinte. Lors de la sublimation de la glace, l'enceinte de lyophilisation est saturée en vapeur d'eau, et la valeur de pression mesurée par la jauge Pirani, est supérieure à celle indiquée par le manomètre capacitif. Lorsque la sublimation de la glace est terminée, l'enceinte de lyophilisation est composée majoritairement d'azote, ce qui se traduit par une diminution de la valeur de pression mesurée par la jauge Pirani. La fin de l'étape de sublimation peut donc être estimée, lorsque la différence entre les deux valeurs de pression, devient égale à zéro. Par ailleurs, l'allure de la chute de la valeur de pression, mesurée par la jauge Pirani, renseigne indirectement sur l'homogénéité des débits de sublimation. En effet, une chute brutale peut être associée à un comportement homogène de l'ensemble des flacons (Passot et al., 2009). L'augmentation de la température de nucléation permet d'augmenter la taille des cristaux de glace et, par conséquent, de réduire la durée de sublimation. Par ailleurs, le contrôle de la température de nucléation permet d'améliorer significativement l'homogénéité des vitesses de sublimation

II.4.1.3. Le développement de capteurs non invasifs pour le suivi du procédé de lyophilisation

Dans le cadre du projet européen CAFE, visant à développer des modes intelligents de conduite de différents procédés alimentaires (lyophilisation de bactéries lactiques, filtration de la bière, fermentation alcoolique, cristallisation de la crème glacée), plusieurs capteurs non invasifs ont été testés : sondes d'impédance haute fréquence, sondes d'impédance acoustique, technologies de nez et de langue électronique. En collaboration avec l'équipe de Corrado Di Natale (University of Rome Tor Vergata), nous avons montré la capacité du nez électronique, pour évaluer la qualité d'échantillons de bactéries lyophilisées, comme l'activité de l'eau et l'activité acidifiante (**Figure 33**) (Capuano et al., 2011).

II.4.2 Apport de la modélisation : de l'échelle du procédé à l'échelle de la cellule

II.4.2.1. Développement d'un logiciel d'aide au développement des cycles de lyophilisation (LyOptM)

L'ensemble des résultats expérimentaux générés, dans le cadre du projet européen Lyopro, a été utilisé pour élaborer un modèle unidimensionnel, représentant les cinétiques de transfert de chaleur et de matière, lors des étapes de sublimation et de désorption. Un paramètre qualité a été intégré dans ce modèle,

la température de transition vitreuse, afin de gérer explicitement le compromis, entre productivité et qualité du produit (Trelea et al., 2007). Le logiciel LyOptM permet à l'utilisateur de choisir, de manière interactive, le profil temporel des deux variables opératoires du procédé, la température étagère et la pression. Ayant, au préalable, déterminé et enregistré dans le logiciel, certaines propriétés de la formulation protectrice, l'utilisateur peut facilement visualiser les zones à risque du cycle pour la qualité du produit, et ajuster en conséquence, les paramètres opératoires (**Figure 34**). Ce modèle unidimensionnel de prédiction des cinétiques de déshydratation, a servi de base aux travaux du projet européen CAFE, pour concevoir une architecture mathématique et informatique, assurant le contrôle et l'optimisation en temps réel du procédé de lyophilisation de bactéries lactiques (Antelo et al., 2012). La **Figure 35** illustre l'organisation de l'outil de conduite, intégrant une base de données, pour la récupération des données du procédé, et un algorithme d'optimisation, permettant d'ajuster en temps réel les variables opératoires, pour rester, au plus proche, d'une cible qualité optimale préalablement définie. Cet outil a été validé à l'échelle pilote et peut être facilement transposable à tout type d'équipement.

Dans le cadre du projet Oseo Naturatech, le logiciel LyOptM, adapté à la lyophilisation de bactéries lactiques, a été amélioré avec l'ajout de boîtes à outils, permettant l'estimation assistée des paramètres clé du modèle, comme les coefficients de transfert de chaleur et de matière et la capacité évaporatoire maximale de l'équipement. Des protocoles standardisés ont été définis, et le traitement des données a été automatisé, pour calculer les paramètres du modèle, paramètres fonction de la composition du produit, du container (flacon, plateau), et de l'équipement.

II.4.2.2. Compréhension des phénomènes de transfert de chaleur et de matière lors du procédé de lyophilisation

Les outils de modélisation, associés à des mesures expérimentales, ont été utilisés pour améliorer nos connaissances concernant des phénomènes physiques peu décrits dans la littérature :

- l'influence du mode de congélation, en couche compacte ou en bille, sur la cinétique de déshydratation (Trelea et al., 2009),
- le transfert de matière au sein de la chambre de lyophilisation (Trelea et al., 2015),
- la cinétique de désorption de l'eau non congelée dans les produits (Trelea et al., 2016).

L'étape de désorption joue un rôle clé, pour la stabilité au stockage de la fonctionnalité biologique (Passot et al., 2012b). La plupart des modèles publiés dans la littérature, utilise une cinétique de désorption du premier ordre, alors que les données expérimentales révèlent des vitesses différentes d'élimination des molécules d'eau, selon leur position dans les couches d'hydratation de la matrice. Les molécules d'eau de la monocouche d'hydratation, fortement liées à la matrice, présenteraient une cinétique de désorption nettement plus lente que les molécules d'eau présentes dans les multicouches d'hydratation. Nous avons proposé un modèle décrivant la désorption de plusieurs compartiments de molécules d'eau, caractérisés par différentes constantes de désorption, selon le niveau de liaison des molécules d'eau. Dans le cas de la lyophilisation de suspensions bactériennes, un modèle de cinétique de désorption à deux compartiments a été retenu.

Dans le cadre de la thèse de Bernadette Scutella (collaboration industrielle avec GlaxoSmithKline), les outils de modélisation ont été appliqués, pour quantifier les risques liés au changement d'échelle, dans le cas de la lyophilisation de vaccins. La position du flacon sur l'étagère de l'équipement de lyophilisation, constitue un élément clé pour la qualité finale du produit. En effet, les flacons positionnés en périphérie des étagères présentent des valeurs de température de produit plus élevées, que les flacons placés au centre, ce qui constitue un risque d'effondrement des produits lyophilisés. Cet apport de chaleur supplémentaire, reçu par les flacons en périphérie, a été attribué, dans la littérature, à un transfert de chaleur par rayonnement, entre les parois de l'équipement et le produit (Hottot et al., 2006; Sheehan and Liapis, 1998; Velardi and Barresi, 2008; Zhai et al., 2005). Un modèle mathématique 3D a été développé en utilisant le logiciel COMSOL multiphysics®, pour quantifier les différents mécanismes de transfert de chaleur, lors de la sublimation des cristaux de glace (Scutella et al., 2017c). La **Figure 36A** illustre la géométrie utilisée pour décrire une portion représentative de l'enceinte de lyophilisation, incluant, la paroi de l'équipement, deux étagères, le cadre métallique entourant les flacons, et cinq flacons en verre. Les flacons situés en périphérie de l'étagère sont, soit en contact avec le cadre métallique (vial C), soit légèrement décalés du cadre (vial D). Le flacon M est considéré comme représentatif d'un flacon situé au centre de l'étagère, et non soumis aux effets de bord. La **Figure 36B** schématise les différents mécanismes de transfert de chaleur pris en compte dans l'étude. La présence de gaz dans l'enceinte de lyophilisation a été considérée, et une approche originale a été utilisée pour décrire le transfert de chaleur, par conduction au sein du gaz, dans le régime de Knudsen. Une couche fictive, entourant tous les éléments solides (glace, flacon, cadre métallique, paroi, étagères), a été définie (représentée en violet sur la **Figure 36B**). Le modèle a été validé expérimentalement, pour une large gamme de conditions opératoires, et la contribution des différents éléments du système au transfert de chaleur a été quantifiée (**Figure 37**). L'utilisation de ce modèle a permis de mettre en évidence, que le transfert de chaleur par conduction dans le gaz (vapeur d'eau), était responsable du flux de chaleur additionnel, reçu par les flacons situés en périphérie de l'étagère. La contribution des phénomènes radiatifs apparaît relativement faible, entre 5 et 14 % de la chaleur totale reçue par les flacons. Ce modèle mathématique a ensuite été utilisé pour étudier l'influence, sur les effets de bords, de différents paramètres de conception des équipements de lyophilisation, comme le mode de chargement des flacons (hauteur du cadre métallique, absence du cadre), les propriétés thermiques des éléments (émissivité des étagères, des parois, conductivité thermique du cadre), l'espacement entre les étagères, la distance entre les parois de l'équipement et les étagères (Scutella et al., 2018a).

II.4.2.3. Influence de la variabilité des coefficients de transfert de chaleur et de matière sur la qualité finale du produit

Les travaux de thèse de Bernadette avaient pour objectif, de développer un outil de prédiction du risque d'obtenir un produit non conforme, lors du changement d'échelle du procédé de lyophilisation, passage de l'échelle pilote à l'échelle industrielle. L'approche a reposé, sur la quantification expérimentale des sources de variabilité des transferts de chaleur et de matière, lors des étapes de sublimation et de désorption (**Figure 38**), et sur la prise en compte de ces variabilités dans un modèle mécanistique (**Figure**

39). La **Figure 38A** illustre l'effet de la variabilité de deux caractéristiques géométriques des flacons, l'aire de contact entre le flacon et l'étagère, et la courbure du fond de flacon, sur le coefficient de transfert de chaleur K_v (Scutellà et al., 2017b). La variabilité du coefficient K_v , déterminée expérimentalement pour des flacons situés au centre de l'étagère, a été expliquée par les caractéristiques géométriques des flacons. Pour des pressions opératoires inférieures à 30 Pa, la distribution du coefficient K_v est gouvernée par l'aire de contact entre le flacon et l'étagère. En revanche pour des valeurs de pressions supérieures à 30 Pa, c'est l'influence de la concavité des flacons, qui devient majoritaire.

La nature stochastique du phénomène de nucléation, lors de l'étape de congélation, influence, non seulement la résistance au transfert de matière lors de la sublimation mais également, la cinétique de désorption. La distribution, au sein d'un lot de flacons, du paramètre de résistance de la couche sèche du produit au transfert de matière (R_p), est représentée sur la **Figure 38B**, et apparaît fortement dépendante du contrôle de la température de nucléation (Scutella et al., 2018b). La distribution des constantes de désorption, issues du modèle développé (Trelea et al., 2016), a été quantifiée à partir de données expérimentales, et utilisée pour prédire la distribution des valeurs de teneur en eau résiduelle, dans un lot de flacons (Scutellà et al., 2017a).

Les paramètres associés aux différentes sources de variabilité, identifiées lors du procédé de lyophilisation, ont été intégrés dans un modèle mathématique dynamique multi-flacons, développé sous Matlab®, pour prédire le pourcentage de flacons non conforme, selon les conditions opératoires appliquées. La simulation a été réalisée pour un lot de 100 flacons remplis d'une solution de saccharose à 5%, représentative d'une formulation de vaccins (**Figure 39**).

II.4.2.4 Modélisation à l'échelle de la cellule

Dans l'optique de quantifier les mécanismes de dégradation de l'activité acidifiante des bactéries lactiques, nous avons cherché à modéliser le comportement de la cellule bactérienne lors des procédés de stabilisation. Dans le cadre de notre collaboration avec l'Université du Minnesota, nous avons déterminé la perméabilité à l'eau de membrane de *L. bulgaricus* CFL1, ce qui nous a permis de prédire l'évolution du volume cellulaire lors du procédé de congélation, et d'évaluer ainsi l'effet de la vitesse de congélation, sur le niveau de déshydratation cellulaire (**Figure 40**). En considérant le phénomène de vitrification intracellulaire, le modèle prédit une déshydratation cellulaire relativement limitée, pour des vitesses de refroidissement supérieures à 5 °C.min⁻¹.

Lors du projet européen CAFE, nous avons observé une perte d'activité acidifiante moindre, lorsque la température du produit est maintenue proche de la température d'effondrement, lors de l'étape de sublimation. Nous avons émis l'hypothèse, que la vitesse de dégradation de l'activité acidifiante était liée à l'histoire thermique du produit au cours du procédé, et notamment à l'écart entre la température du produit et la température de transition vitreuse. Des essais expérimentaux ont été réalisés, afin d'établir une relation quantitative entre la perte d'activité acidifiante, et la différence de température entre le produit et la transition

vitreuse (**Figure 41A**). Cette relation quantitative a été intégrée dans le modèle LyOptM, afin de prédire la perte d'activité acidifiante, lors du procédé de lyophilisation, en fonction des conditions opératoires appliquées (**Figure 41B**) (Passot et al., 2011b).

Conclusion :

Nos travaux relatifs à l'optimisation du procédé de lyophilisation, ont permis non seulement la validation d'outils d'aide au développement de formules protectrices et de cycles de lyophilisation mais également, l'amélioration de nos connaissances sur les phénomènes de transfert et de chaleur et de matière.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les travaux de recherche, réalisés depuis une quinzaine d'années, ont eu pour objectif d'améliorer la maîtrise des procédés de stabilisation de fonctionnalités biologiques. Les différents aspects abordés traduisent une approche pluridisciplinaire, intégrant le génie des procédés, le génie microbiologie, la biophysique et la modélisation. Cette approche s'appuie sur des développements méthodologiques forts, assurant une caractérisation approfondie du comportement du matériau, lors des opérations de stabilisation, à différentes échelles (de l'échelle macroscopique de la matrice à l'échelle moléculaire des composants cellulaires). Les résultats ont permis des avancées conséquentes dans la compréhension des mécanismes physiques de dégradation et de protection des bactéries lactiques, lors des procédés de congélation et lyophilisation, avec un souci permanent de généralisation, et de développement d'outils d'aide à la formulation et à la conduite des procédés.

Mes activités de recherche ont nécessité le déploiement d'un réseau de collaborations non seulement au sein de l'unité mais aussi, à l'échelle nationale et internationale, avec des chercheurs de disciplines très diverses. Ces échanges scientifiques ont été passionnants, stimulants et enrichissants. Les relations établies avec un nombre conséquent de partenaires industriels, m'ont permis de rester proche des enjeux et des réalités industrielles et économiques, aspects importants dans le cadre d'une recherche finalisée.

En termes de valorisation, mes travaux se traduisent par 30 publications dans des revues scientifiques à comité de lecture, 28 conférences invitées et de nombreuses communications dans des congrès internationaux.

Pour les années à venir, l'ambition de mon projet scientifique est la conception d'itinéraires technologiques durables de production d'agents biologiques à haute fonctionnalité. Les micro-organismes constituent des acteurs majeurs non seulement dans le domaine agroalimentaire, permettant une diversité incroyable de produits fermentés, mais également, dans le domaine non alimentaire, pour la production de biomolécules à partir de la biomasse végétale. Par ailleurs, ils restent largement utilisés dans les pays en voie de développement pour conserver les matières premières agricoles, limiter le gaspillage et fournir des produits à haute valeur nutritionnelle. Le besoin en micro-organismes sous forme concentrée, stabilisée et prête à l'emploi est croissant, et la maîtrise du procédé de production devient, aujourd'hui, un enjeu important. Des innovations sont notamment attendues pour simplifier et fiabiliser le processus de production, et pour minimiser le recours à la chaîne du froid, en assurant une stabilité à long terme à température ambiante. Mon objectif est de m'appuyer sur les compétences présentes au sein de la future unité de recherche GENIAL-GMPA, pour construire une véritable approche d'étude systémique du processus de production, de l'étape de fermentation à l'utilisation finale par le consommateur, intégrant trois dimensions: la fonctionnalité du micro-organisme, la performance industrielle et la durabilité du processus. Je souhaite orienter mes travaux selon deux axes de recherche présentés sur la **Figure 42**:

1. l'identification de marqueurs cellulaires de résistances aux stress induits par les procédés de stabilisation,

2. l'évaluation de la durabilité du système de production de fonctionnalités microbiennes stabilisées.

Le processus de production de micro-organismes, sous forme concentrée et stabilisée, fait intervenir une succession d'étapes. Chaque étape peut influencer sur la qualité finale du produit et la non maîtrise d'une étape peut entraîner une forte variabilité de la fonctionnalité. Lors d'une étape, plusieurs choix de procédés peuvent être possibles : centrifugation ou microfiltration pour l'étape de concentration, congélation, lyophilisation ou séchage en lit fluidisé pour l'étape de stabilisation. En combinant le choix du procédé et des variables opératoires, une multitude d'itinéraires technologiques est alors possible pour stabiliser un micro-organisme. Le choix final de l'itinéraire devra être basé sur trois critères : la fonctionnalité finale du micro-organisme (axe 1), la durabilité de l'itinéraire, notamment l'impact environnemental, et la performance industrielle (axe 2).

Le premier critère à considérer est la maximisation de la fonctionnalité de la population microbienne. L'objectif de ce premier axe de recherche s'inscrit dans la continuité de mes travaux, avec l'identification des déterminants de résistance des cellules aux contraintes environnementales, imposées par le système de production. Ce dernier peut également être défini, comme une succession de stress environnementaux, auxquels les cellules vont être exposées et répondre de façon active ou passive, entraînant des pertes de fonctionnalité. Afin de minimiser ces pertes, il est indispensable de comprendre les mécanismes cellulaires gouvernant la résistance des cellules aux stress rencontrés, et les leviers opératoires pour limiter ces stress. La compréhension de la construction de la fonctionnalité d'une population microbienne nécessite une approche de caractérisation multi-échelle.

Le deuxième critère concerne l'évaluation de la durabilité des itinéraires possibles, en se focalisant, dans un premier temps, sur l'analyse de leur impact environnemental. Certaines étapes du processus sont fortement consommatrices en eau et en énergie. L'approche, que je souhaite développer, est l'intégration de toutes les étapes du système, dans les outils d'évaluation environnementale et leur couplage avec les outils du génie des procédés.

AXE 1 : IDENTIFICATION DE MARQUEURS CELLULAIRES DE RESISTANCES AUX STRESS INDUITS PAR LES PROCEDES DE STABILISATION

Nos travaux récents, menés dans le cadre des thèses de H. Velly, J. Gautier et J. Meneghel, nous ont confortés dans la nécessité de caractériser finement, par des approches *in situ*, l'évolution des propriétés biophysiques, biochimiques et physiologiques d'une population bactérienne, lors d'un procédé de stabilisation. Cet axe reste dans la continuité de mes activités de recherche avec les trois originalités suivantes:

- la décomposition du processus de production en une succession de stress environnementaux, et l'étude du comportement des cellules soumises à ces différents stress seuls ou combinés,

- l'application des approches du génie microbiologique, avec notamment la modification des conditions de fermentation, pour créer des populations bactériennes sensibles et résistantes aux procédés de stabilisation, ou pour moduler la réponse passive des bactéries aux stress associés,

- l'application des approches « omiques » (génomique, transcriptomique et protéomique) pour identifier les gènes clés, conférant aux bactéries une résistance aux stress environnementaux imposés par l'itinéraire technologique, et les conditions de fermentation permettant l'expression de ces gènes. Ce point sera développé avec l'aide de Séverine Layec, Maître de Conférences en biologie moléculaire, qui a récemment rejoint l'équipe.

Le développement méthodologique de caractérisation à l'échelle cellulaire, sera poursuivi, avec l'objectif de proposer des approches bi-(multi-)modales, pour le suivi *in situ* et en dynamique, des réponses cellulaires aux stress environnementaux associés aux procédés de stabilisation. Nous souhaitons adapter les outils déjà développés, à l'étude du comportement biophysique et biochimiques d'une cellule bactérienne soumise aux stress environnementaux gouvernant les procédés de déshydratation. Un procédé de déshydratation peut être décomposé en une combinaison de stress thermique (température supérieure à 50 °C), osmotique, oxydatif et mécanique. Dans un premier temps, nous envisageons d'utiliser le dispositif expérimental développé pour étudier la déshydratation de cellules de levures, combinant la microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à une platine de dessiccation, permettant la modification de l'humidité relative et de la température.

Des techniques plus fines de caractérisation physique, structurale et biochimique de la membrane cytoplasmique sont également envisagées, afin de comprendre le rôle spécifique de certains acides gras, acide gras C19 cyclique par exemple, dans la résistance des bactéries lactiques aux procédés de congélation et lyophilisation. Les travaux de thèse de H. Velly et de J. Gautier ont mis évidence un rôle différent de l'acide gras C19 cyclique, sur la propriété de fluidité membranaire, selon le procédé et le modèle bactérien considérés. Ce point sera étudié dans le cadre du projet européen RISE (Research Innovation and Staff Exchange) PREMIUM (Preserving bacteria with oligosaccharides and eco-friendly processes) par l'intermédiaire de construction de membranes biomimétiques. Des extraits lipidiques de populations

bactériennes, présentant différentes compositions en acides gras et résistances aux procédés, seront utilisés pour réaliser ces membranes biomimétiques.

Par ailleurs, depuis quelques années, notre équipe a accumulé des résultats probants sur l'importance des phénomènes d'oxydation, lors du procédé de lyophilisation et du stockage à l'état lyophilisé des bactéries. Dans le cadre de la thèse de Hélène Velly, l'analyse des profils transcriptomiques et protéomiques de *L. lactis*, au cours de l'étape de fermentation, a révélé, en phase stationnaire avancée, la surexpression de gènes, codant pour des protéines et des complexes métalliques, piègeurs des espèces réactives à l'oxygène. Cette surexpression induit une amélioration de la résistance bactérienne au procédé de lyophilisation et au stockage. En 2011, nous avons initié une collaboration avec l'équipe de Clotilde Policar (Pr, ENS Ulm) pour étudier le mécanisme d'action d'un complexe manganèse présentant une activité anti-superoxyde, développé par son équipe. Ces travaux vont se poursuivre dans le cadre du projet européen PREMIUM et nous envisageons de déposer un projet de thèse à l'école doctorale ABIES pour caractériser et comprendre les phénomènes d'oxydation, lors de la production de bactéries lactiques lyophilisées.

AXE 2 : EVALUATION DE LA DURABILITE DU SYSTEME DE PRODUCTION DE FONCTIONNALITES MICROBIENNES STABILISEES

Outre la préservation de la fonctionnalité biologique, un critère devient, aujourd'hui, important à intégrer, dans le choix de l'itinéraire technologique à mettre en œuvre: l'impact environnemental et la durabilité du système de production. Le procédé de congélation assure généralement une préservation optimale de la fonctionnalité, mais requiert le déploiement conséquent de la chaîne du froid ($T^{\circ} < -40^{\circ}\text{C}$) pour le transport et le stockage. Le procédé de lyophilisation permet une réduction des quantités à transporter, et une température de stockage autour de 4°C , avec des pertes de fonctionnalités plus ou moins modérées selon les bactéries. Inversement, l'application d'un procédé de séchage à air chaud (séchage par atomisation, séchage en lit fluidisé) implique des pertes importantes de fonctionnalités, mais permet une distribution à température ambiante. Le choix de l'itinéraire technologique apparaît donc peu trivial et doit s'appuyer sur une méthodologie solide de comparaison multi-critères des itinéraires.

Avec le recrutement de Caroline Pénicaud (CR INRA) en 2010, nous avons démarré une réflexion méthodologique sur les outils d'évaluation de la durabilité, et notamment de l'impact environnemental, et l'application de ces outils à notre système d'étude. La démarche d'analyse de cycle de vie (ACV) est devenue un outil incontournable, et nous avons décidé de l'appliquer à la comparaison de deux scénarii de production de bactéries lactiques stabilisées : congélation *versus* lyophilisation (Penicaud et al., 2018). Ces travaux ont permis de valider la méthodologie de mesure de la consommation énergétique des équipements, et la faisabilité de raisonner à l'échelle pilote. Ils ont également soulevé certains verrous, comme la définition de l'unité fonctionnelle, incluant la quantité et la qualité de la fonctionnalité, le changement d'échelle des procédés, et la nécessité de mutualiser les connaissances issues de l'ACV et du génie des procédés. Nous avons initié le couplage de ces deux outils dans notre modèle de prédiction des cinétiques de lyophilisation LyOptM.

Dans l'objectif de poursuivre ces travaux et de proposer des alternatives technologiques aux procédés de lyophilisation, le projet européen PREMIUM, coordonné par l'INRA, a été construit et a démarré le 1^{er} janvier 2018. PREMIUM est un projet multidisciplinaire sur 4 ans, d'échange de personnels entre 5 partenaires académiques (INRA, AgroParisTech, France; ICFO, Espagne, l'université de Madère, l'université de Coimbra, Portugal et le CONICET, Argentine) et 3 industriels (Biosearch life, Espagne, Asymptote GE Healthcare, Royaume Uni et Cryolog, France). L'objectif de ce projet est de développer des stratégies innovantes pour la stabilisation à long terme de bactéries lactiques, de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle, en prenant en compte la qualité du produit, la performance industrielle et l'impact environnemental. Les approches complémentaires suivantes vont être abordées dans le projet PREMIUM:

- la mise au point de nouvelles molécules protectrices, comme des oligosaccharides (fructo-oligosaccharides (FOS) ou des galacto-oligosaccharides (GOS), en s'appuyant sur l'expertise du CONICET et de l'université de Madère,

- la mise au point de nouveaux procédés de stabilisation, en utilisant la technique d'encapsulation développée par l'université de Coimbra, et la combinaison de cette technique avec les procédés de lyophilisation et de séchage par atomisation,

- le développement d'une méthodologie rigoureuse pour comparer les différents scénarii de production en se basant sur l'analyse multi-critères (collaboration avec Caroline Pénicaud, INRA, GMPA).

L'intégration des dimensions économiques et sociales dans l'évaluation de la durabilité du processus, nécessitera le développement de collaborations dans les années à venir. Le rapprochement futur entre les UMR GMPA et GENIAL, devrait permettre de mutualiser les expertises en procédés de séchage et en modélisation, ce qui représente une opportunité importante pour le montage de projets à l'échelle nationale et européenne. Les collaborations entre les acteurs franciliens du futur pôle Paris-Saclay seront également à renforcer. Je veillerais également à poursuivre notre stratégie de partenariat industriel, indispensable à l'innovation et au transfert de connaissances.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antelo, L.T., Passot, S., Fonseca, F., Trelea, I.C., Alonso, A.A., 2012. Toward Optimal Operation Conditions of Freeze-Drying Processes via a Multilevel Approach. *Drying Technology* 30, 1432-1448.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C., Carpenter, J.F., 2001. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46, 307-326.
- Arrondo, J.L.R., Goni, F.M., 1998. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 96, 53-68.
- Beal, C., Marin, M., Fonseca, F., Corrieu, G., 2001. Procédé de préparation d'une composition lyophilisée contenant des bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors d'un stockage à température ambiante et composition obtenue, France.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F., Obert, J.P., 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques, in: Corrieu, G., Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques: De la génétique aux ferments*. Lavoisier, Paris.
- Beney, L., Gervais, P., 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 34-42.
- Bernard, A.S., Giroud, C., Ching, H.Y.V., Meunier, A., Ambike, V., Amatore, C., Collignon, M.G., Lemaitre, F., Policar, C., 2012. Evaluation of the anti-oxidant properties of a SOD-mimic Mn-complex in activated macrophages. *Dalton Transactions* 41, 6399-6403.
- Bouix, M., Ghorbal, S., 2017. Assessment of bacterial membrane fluidity by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 143, 50-57.
- Broadbent, J.R., Lin, C., 1999. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* 39, 88-102.
- Capuano, R., Santonico, M., Martinelli, E., Paolesse, R., Passot, S., Fonseca, F., Cenard, S., Trelea, C., Di Natale, C., 2011. Electronic Nose Characterization of the Quality Parameters of Freeze-Dried Bacteria, 14th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose, New York, pp. 125-126.
- Castro, H.P., Teixeira, P.M., Kirby, R., 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 172-176.
- Cisnetti, F., Lefèvre, A.S., Guillot, R., Lambert, F., Blain, G., Anxolabéhère-Mallart, E., Policar, C., 2007a. A new pentadentate ligand forms both a di- and a mono-nuclear Mn(II) complex : electrochemical, spectroscopic and superoxide dismutase activity studies. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 4472-4480.
- Cisnetti, F., Pelosi, G., Policar, C., 2007b. Synthesis and superoxide dismutase-like activity of new manganese(III) complexes based on tridentate N2O ligands derived from histamine. *Inorganica Chimica Acta* 360, 557-562.
- Clarke, A., Morris, G.J., Fonseca, F., Murray, B.J., Acton, E., Price, H.C., 2013. A Low Temperature Limit for Life on Earth. *PLoS One* 8.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 60, 73-103.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., Ancho doguy, T.J., 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interactions of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219-231.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Mouradian, R., 1983. Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology* 20, 346-356.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54, 579-599.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., Ancho doguy, T.J., Drobnis, E., 1989. Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Cryobiology* 26.
- Crowe, J.H., Ried, D.S., Crowe, L.M., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal* 71, 2087-2093.
- Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Kiang, J.G., Fukumoto, R., Lee, D.Y., Wehr, N.B., Viteri, G.A., Berlett, B.S., Levine, R.L., 2010. Small-Molecule Antioxidant Proteome-Shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 5.

- Desfougeres, Y., Croguennec, T., Lechevalier, V., Bouhallab, S., Nau, F., 2010. Charge and Size Drive Spontaneous Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins into Microspheres. *Journal of Physical Chemistry B* 114, 4138-4144.
- Devireddy, R.V., Raha, D., Bischof, J.C., 1998. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiology* 36, 124-155.
- Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N.P., 2012. Role of Calcium Alginate and Mannitol in Protecting Bifidobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6914-6921.
- Diaz, S.B., de Lopez, A.C.B., Disalvo, E.A., 2003. Dehydration of carbonyls and phosphates of phosphatidylcholines determines the lytic action of lysoderivatives. *Chemistry and Physics of Lipids* 122, 153-157.
- Fonseca, F., Beal, C., Corrieu, G., 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research* 67, 83-90.
- Fonseca, F., Beal, C., Mihoub, F., Marin, M., Corrieu, G., 2003a. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. *International Dairy Journal* 13, 917-926.
- Fonseca, F., Gautier, J., Cenard, S., Passot, S., Jamme, F., Dumas, P., 2011. Probing Live Cellular Responses to freezing by Infrared Spectromicroscopy, CellNanoSpec, Porquerolles, France.
- Fonseca, F., Marin, M., Morris, G.J., 2006. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6474-6482.
- Fonseca, F., Meneghel, J., Cenard, S., Passot, S., Gilham, D., Sheard, V., Morris, G.J., 2015. Initial measurement of the intracellular glass transition of a mammalian cell type under cryopreservation conditions, 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic.
- Fonseca, F., Meneghel, J., Cenard, S., Passot, S., Morris, G.J., 2016. Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular micro-organisms under conditions relevant for cryopreservation. *PLoS One* 11, 1-19.
- Fonseca, F., Obert, J.P., Béal, C., Marin, M., 2001. State diagrams and sorption isotherms of bacterial suspensions and fermented medium. *Thermochimica Acta* 366, 167-182.
- Fonseca, F., Passot, S., Cenard, S., Marin, M., Morris, J., 2007. 103. The glassy state of the freeze-concentrated medium formed during freezing: effects on cryopreservation of *Lb. bulgaricus* cells. *Cryobiology* 55, 358-359.
- Fonseca, F., Passot, S., Cenard, S., Marin, M., Morris, J., 2008. 89. Stabilization of freeze-dried *Lb. Bulgaricus* cells: The freezing kinetics effect. *Cryobiology* 57, 333.
- Fonseca, F., Passot, S., Cunin, O., Marin, M., 2004a. Collapse Temperature of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* Suspensions and Protective Media. *Biotechnology Progress* 20, 229-238.
- Fonseca, F., Passot, S., Lieben, P., Marin, M., 2004b. Collapse temperature of bacterial suspensions: the effect of cell type and concentration. *Cryo-Letters* 25, 425-434.
- Fonseca, F., Passot, S., Marin, M., 2003b. Collapse temperature of bacterial suspensions: Effect of cell concentration, Meeting of the National Institute of Biological Standards, London, UK.
- Fonseca, F., Passot, S., Marin, M., 2004c. An effective property for the formulation of a freeze-dried food ingredient: Glass transition or Collapse ? (communication orale + texte intégral), ICEF 9 - International Congress on Engineering and Food, Montpellier, France, pp. 698-701.
- Frias, M.A., Diaz, S.B., Ale, N.M., Ben Altabef, A., Disalvo, E.A., 2006. FTIR analysis of the interaction of arbutin with dimyristoyl phosphatidylcholine in anhydrous and hydrated states. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758, 1823-1829.
- Gautier, J., Passot, S., Jamme, F., Cenard, S., Fonseca, F., 2012. 28. Using Synchrotron infrared microspectroscopy to better understand the freezing-resistance of lactic acid bacteria. *Cryobiology* 65, 347-348.
- Gautier, J., Passot, S., Penicaud, C., Guillemin, H., Cenard, S., Lieben, P., Fonseca, F., 2013. A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of Dairy Science* 96, 5591-5602.
- Goni, F.M., Arrondo, J.L.R., 1986. A Study of Phospholipid Phosphate Groups in Model Membranes by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy. *Faraday Discussions* 81, 117-126.
- Horsburgh, M.J., Wharton, S.J., Karavolos, M., Foster, S.J., 2002. Manganese: elemental defence for a life with oxygen? *Trends in Microbiology* 10, 496-501.

- Hottot, A., Peczkalski, R., Vessot, S., Andrieu, J., 2006. Freeze-drying of pharmaceutical proteins in vials: Modeling of freezing and sublimation steps. *Drying Technology* 24, 561-570.
- Hua, L., Zhao, W.Y., Wang, H., Li, Z.C., Wang, A.L., 2009. Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. *Food and Bioproducts Processing* 87, 56-61.
- Kurtmann, L., Carlsen, C.U., Risbo, J., Skibsted, L.H., 2009. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology* 58, 175-180.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3592-3597.
- Levine, H., Slade, L., 1986. A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (SHPs). *Carbohydrate Polymers* 6, 213-244.
- Levine, H., Slade, L., 1988. Principles of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water systems - A review. *Cryo-Letters* 9, 21-63.
- Lewis, R., McElhaney, R.N., 1998. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* 96, 9-21.
- Li, C., Zhao, J.L., Wang, Y.T., Han, X., Liu, N., 2009. Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 1659-1665.
- Mazur, P., 1977. Role of Intracellular Freezing in Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. *Cryobiology* 14, 251-272.
- Meneghel, J., Lefrançois, S., Passot, S., Jamme, F., Fonseca, F., Dumas, P., 2015a. Challenges underlying the in situ analysis of single bacterial cells by synchrotron FTIR spectromicroscopy, European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM 16), Bochum, Germany.
- Meneghel, J., Passot, S., Cenard, S., Refregiers, M., Jamme, F., Fonseca, F., 2017a. Subcellular membrane fluidity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* under cold and osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 6907-6917.
- Meneghel, J., Passot, S., Cenard, S., Xu, J., Refregiers, M., Jamme, F., Fonseca, F., 2015b. Mapping membrane fluidity by fluorescence anisotropy to better understand bacterial tolerance to osmotic and cold stresses encountered during freezing, 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic.
- Meneghel, J., Passot, S., Dupont, S., Fonseca, F., 2017b. Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 1427-1441.
- Meneghel, J., Passot, S., Jamme, F., Réfrégiers, M., Cenard, S., Xu, J., Dumas, P., Fonseca, F., 2015c. Dynamic characterization of membrane biophysical properties to better understand bacterial tolerance to osmotic and cold stresses encountered during freezing, *Microbial stress: From molecules to systems*, Sitges, Spain.
- Meneghel, J., Xu, J., Cenard, S., Sockalingum, G., Passot, S., Dumas, P., Fonseca, F., 2015d. Using Raman spectroscopy to understand the osmotic stress response of lactic acid bacteria, XXIèmes journées du Groupe Français de Spectroscopies Vibratoires (GFSV), Reims, France.
- Nguyen, T.D., Guyot, S., Penicaud, C., Passot, S., Sandt, C., Fonseca, F., Saurel, R., Husson, F., 2017. Understanding the responses of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during dehydration processes using synchrotron infrared spectroscopy. *Analyst* 142, 3620-3628.
- Nigen, M., Croguennec, T., Bouhallab, S., 2009. Formation and stability of alpha-lactalbumin-lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. *Food Hydrocolloids* 23, 510-518.
- Nigen, M., Gaillard, C., Croguennec, T., Madec, M.N., Bouhallab, S., 2010. Dynamic and supramolecular organisation of alpha-lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. *Biophysical Chemistry* 146, 30-35.
- Oldenhof, H., Wolkers, W.F., Fonseca, F., Passot, S., Marin, M., 2005. Effect of Sucrose and Maltodextrin on the Physical Properties and Survival of Air-Dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Biotechnology Progress* 21, 885-892.
- Passot, S., Bouix, M., Gautier, J., Lieben, P., Cenard, S., Ghorbal, S., Fonseca, F., 2012a. Relevance of cell biophysical behaviour and membrane fluidity for explaining freezing resistance of lactic acid bacteria, 49th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina, p. 355.
- Passot, S., Cenard, S., Douania, I., Trelea, I.C., Fonseca, F., 2012b. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 132, 1699-1705.

- Passot, S., Cenard, S., Douania, I., Tréléa, I.C., Fonseca, F., 2010a. Water in freeze-dried lactic acid bacteria: Friend or Foe, EuroFoodWater, Reims, France.
- Passot, S., Fonseca, F., Alarcon-Lorca, M., Rolland, D., Marin, M., 2005. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 335-348.
- Passot, S., Fonseca, F., Barbouche, N., Marin, M., Alarcon-Lorca, M., Rolland, D., Rapaud, M., 2007. Effect of product temperature during primary drying on the long-term stability of lyophilized proteins. *Pharmaceutical Development and Technology* 12, 543-553.
- Passot, S., Fonseca, F., Brothier, F., Bouhallab, S., 2011a. The physical behavior of food protein's supramolecular structure during freeze-drying, ICEF 11, International Congress of Engineering and Food, Athens, Greece.
- Passot, S., Fonseca, F., Cenard, S., Douania, I., Tréléa, I.C., 2011b. Quality degradation of lactic acid bacteria during the freeze drying process: Experimental study and mathematical modelling, ICEF 10, International Congress of Engineering and Food, Athens, Greece.
- Passot, S., Fonseca, F., Marin, M., 2006. Physical and biological stability of freeze-dried polymer-sucrose protein formulations related to water activity. (communication orale), Amorph 2006, Cambridge, UK.
- Passot, S., Fonseca, F., Skepper, J., Morris, G.J., 2014a. How to increase freeze-drying recovery of biological products by manipulating the ice crystal morphology, 45th Annual Conference of the British Association for Crystal Growth, Leeds, UK.
- Passot, S., Gautier, J., Jamme, F., Cenard, S., Dumas, P., Fonseca, F., 2015. Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Analyst* 140, 5920-5928.
- Passot, S., Jamme, F., Réfrégiers, M., Gautier, J., Cenard, S., Fonseca, F., 2013. Towards the measurement of membrane fluidity at subzero temperatures for improving cell cryopreservation, European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM 15), Oxford, UK.
- Passot, S., Jamme, F., Réfrégiers, M., Gautier, J., Cenard, S., Fonseca, F., 2014b. Synchrotron UV fluorescence microscopy for determining membrane fluidity modification of single bacteria with temperatures. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 3, 203-210.
- Passot, S., Rault, A., Cenard, S., Fonseca, F., 2010b. 35. Cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Towards a quantitative understanding of the cell biophysical response during freezing. *Cryobiology* 61, 372.
- Passot, S., Tréléa, I.C., Marin, M., Fonseca, F., 2010c. The relevance of thermal properties for improving formulation and cycle development: Application to freeze-drying of proteins, in: Rey, L., May, J.C. (Eds.), *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and biological Products*, 3rd Edition ed. Informa Healthcare USA Inc., New York.
- Passot, S., Trelea, I.C., Marin, M., Galan, M., Morris, G.J., Fonseca, F., 2009. Effect of Controlled Ice Nucleation on Primary Drying Stage and Protein Recovery in Vials Cooled in a Modified Freeze-Dryer. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* 131.
- Penicaud, C., Monclus, V., Perret, B., Passot, S., Fonseca, F., 2018. Life cycle assessment of the production of stabilized lactic acid bacteria for the environmentally-friendly preservation of living cells. *Journal of Cleaner Production* 184, 847-858.
- Pikal, M.J., 1999. Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage : The relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics, in: Rey, L., May, J.C. (Eds.), *Freeze-drying / Lyophilisation of pharmaceutical and biological products*. Marcel Dekker, NeW York, pp. 161-198.
- Pikal, M.J., Shah, S., 1990. The collapse temperature in freeze drying : Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy state. *International Journal of Pharmaceutics* 62, 165-186.
- Rault, A., Beal, C., Ghorbal, S., Ogier, J., Bouix, M., 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage *Cryobiology* 55, 35-42.
- Rault, A., Bouix, M., Beal, C., 2010. Cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CFL1 is influenced by the physiological state during fermentation. *International Dairy Journal* 20, 792-799.
- Santivarangkna, C., Aschenbrenner, M., Kulozik, U., Foerst, P., 2011. Role of Glassy State on Stabilities of Freeze-Dried Probiotics. *Journal of Food Science* 76, R152-R156.
- Santivarangkna, C., Higl, B., Foerst, P., 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology* 25, 429-441.

- Santoro, M.M., Liu, Y., Khan, S.M.A., Hou, L.X., Bolen, D.W., 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 31, 5278-5283.
- Saulou, C., Jamme, F., Girbal, L., Maranges, C., Fourquaux, I., Coccagn-Bousquet, M., Dumas, P., Mercier-Bonin, M., 2013. Synchrotron FTIR microspectroscopy of *Escherichia coli* at single-cell scale under silver-induced stress conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 2685-2697.
- Saulou, C., Jamme, F., Maranges, C., Fourquaux, I., Despax, B., Raynaud, P., Dumas, P., Mercier-Bonin, M., 2010. Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 1441-1450.
- Schoug, A., Fischer, J., Heipieper, H.J., Schnuerer, J., Hakansson, S., 2008. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* S13. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35, 175-181.
- Scutella, B., Bourles, E., Plana-Fattori, A., Fonseca, F., Flick, D., Trelea, I.-C., Passot, S., 2018a. Effect of Freeze Dryer Design on Heat Transfer Variability Investigated Using a 3D Mathematical Model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107, 2098-2106.
- Scutellà, B., Bourlès, E., Tordjman, C., Fonseca, F., Mayeresse, Y., Trelea, I.C., Passot, S., 2017a. Can the desorption kinetics explain the residual moisture content heterogeneity observed in pharmaceuticals freeze-drying process?, EuroDrying'2017, 6th European Drying Conference, Liège, Belgium.
- Scutellà, B., Passot, S., Bourles, E., Fonseca, F., Trelea, I.C., 2017b. How Vial Geometry Variability Influences Heat Transfer and Product Temperature During Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106, 770-778.
- Scutellà, B., Plana-Fattori, A., Passot, S., Bourles, E., Fonseca, F., Flick, D., Trelea, I.C., 2017c. 3D mathematical modelling to understand atypical heat transfer observed in vial freeze-drying. *Applied Thermal Engineering* 126, 226-236.
- Scutella, B., Trelea, I.C., Bourles, E., Fonseca, F., Passot, S., 2018b. Determination of the dried product resistance variability and its influence on the product temperature in pharmaceutical freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 128, 379-388.
- Sheehan, P., Liapis, A.I., 1998. Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials: numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multi-dimensional lyophilization model for different operational policies. *Biotechnology and Bioengineering* 60, 712-728.
- Slade, D., Radman, M., 2011. Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 133-+.
- Son, C.K., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.A., Guzzo, J., 2005. Combined, cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1717, 118-124.
- Streit, F., Corrieu, G., Beal, C., 2007. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Biotechnology* 128, 659-667.
- Trelea, I.C., Fonseca, F., Passot, S., 2016. Dynamic Modelling of the Secondary Drying Stage of Freeze-Drying Reveals Distinct Desorption Kinetics for Bound Water. *Drying Technology* 34, 335-345.
- Trelea, I.C., Fonseca, F., Passot, S., Flick, D., 2015. A Binary Gas Transport Model Improves the Prediction of Mass Transfer in Freeze-Drying. *Drying Technology* 33, 1849-1858.
- Trelea, I.C., Passot, S., Fonseca, F., Marin, M., 2007. An interactive tool for the optimization of freeze-drying cycles based on quality criteria. *Drying Technology* 25, 741-751.
- Trelea, I.C., Passot, S., Marin, M., Fonseca, F., 2009. Model for Heat and Mass Transfer in Freeze-Drying of Pellets. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* 131.
- Velardi, S.A., Barresi, A.A., 2008. Development of simplified models for the freeze-drying process and investigation of the optimal operating conditions. *Chemical Engineering Research & Design* 86, 9-22.
- Velly, H., Bouix, M., Passot, S., Penicaud, C., Beinstener, H., Ghorbal, S., Lieben, P., Fonseca, F., 2015. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* TOMSC161. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 907-918.
- Velly, H., Fonseca, F., Passot, S., Delacroix-Buchet, A., Bouix, M., 2014. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology* 117, 729-740.
- Wang, Y., Corrieu, G., Beal, C., 2005a. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science* 88, 21-29.

- Wang, Y., Delettre, M., Guillot, A., Corrieu, G., Beal, C., 2005b. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* 50, 294-307.
- Wolkers, W.F., Hoekstra, F.A., 2003. *In situ* FTIR assessment of desiccation-tolerant tissues. *Spectroscopy* 17, 297-313.
- Wu, C., Zhang, J., Wang, M., Du, G., Chen, J., 2012. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39, 1031-1039.
- Zhai, S., Su, H., Taylor, R., Slater, N.K.H., 2005. Pure ice sublimation within vials in a laboratory lyophiliser: comparison of theory with experiment. *Chemical Engineering Science* 60, 1167-1176.
- Zhao, W.Y., Li, H., Wang, H., Li, Z.C., Wang, A.L., 2009. The Effect of Acid Stress Treatment on Viability and Membrane Fatty Acid Composition of *Oenococcus oeni* SD-2a. *Agricultural Sciences in China* 8, 311-316.

ANNEXES

DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DANS L'ENCADREMENT DE THESES DE DOCTORAT

THÈSES SOUTENUES

Bernadette SCUTELLA (2014-2017). Mathematical modelling of the freeze-drying process: mechanisms responsible for product heterogeneity and scale-up risks.

Directeur de thèse: Cristian Tréléa, Pr AgroParisTech

Taux d'encadrement: 40 % (co-encadrement avec Cristian Tréléa et Fernanda Fonseca)

Implication: Définition et rédaction du projet de thèse, définition des questions de recherche et de la démarche scientifique, suivi régulier des résultats et réorientation éventuelle du projet. Participation à la rédaction des articles scientifiques et à la préparation des communications orales.

4 articles acceptés

Julie MENEGHEL (2013-2017). Caractérisation in situ et dynamique des réponses physiologiques et biophysiques des bactéries lactiques aux stress environnementaux subis lors de leur production et de leur utilisation finale.

Directeur de thèse: Fernanda Fonseca, DR INRA et Paul Dumas, DR Synchrotron SOLEIL

Taux d'encadrement: 25 % (co-encadrement avec Fernanda Fonseca, Paul Dumas et Frédéric Jamme)

Implication: Définition et rédaction du projet de thèse, définition des questions de recherche et de la démarche scientifique, suivi régulier des résultats et réorientation éventuelle du projet. Participation à la rédaction des articles scientifiques et à la préparation des communications orales.

2 articles acceptés

Hélène VELLY (2011-2014). Etude de l'évolution de l'état physiologique de *Lactococcus lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation et de son incidence sur la résistance à la lyophilisation et au stockage.

Directeur de thèse: Marielle Bouix, Pr AgroParisTech

Taux d'encadrement: 10 %

Implication: Encadrement des essais de lyophilisation, participation aux discussions d'avancement et à la rédaction des articles scientifiques

2 articles acceptés

THESES EN COURS

Nan YANG (Novembre 2017). Study of oxidation phenomenon occurring during production of freeze-dried lactic acid bacteria and implication on cellular injuries.

Directeur de thèse: Fernanda Fonseca, DR INRA

Taux d'encadrement: 50 % (co-encadrement avec Fernanda Fonseca)

Implication: Définition et rédaction du projet de thèse, définition des questions de recherche et de la démarche scientifique, suivi régulier de l'avancement des recherches bibliographiques et des essais expérimentaux préliminaires

Arrêt de la thèse au 31 octobre 2018

THESES NON SOUTENUES

Sichao ZHU (2014-début 2016). Oxidation mechanisms during lyophilization and dried storage of lactic acid bacteria.

Directeur de thèse: Fernanda Fonseca, DR INRA

Taux d'encadrement: 50 % (co-encadrement avec Fernanda Fonseca)

Implication: Définition et rédaction du projet de thèse, définition des questions de recherche et de la démarche scientifique, suivi régulier de l'avancement des recherches bibliographiques, du choix des méthodes analytiques et des essais expérimentaux.

Julie GAUTIER (2010-2014). Caractérisation et modélisation des mécanismes biophysiques impliqués lors de la congélation de bactéries lactiques et de leurs conséquences physiologiques.

Directeur de thèse: Fernanda Fonseca, DR INRA

Taux d'encadrement: 50 % (co-encadrement avec Fernanda Fonseca)

Implication: Définition et rédaction du projet de thèse, définition des questions de recherche et de la démarche scientifique, suivi régulier de l'avancement des recherches bibliographiques, du choix des méthodes analytiques et des essais expérimentaux.

3 articles acceptés

Inès DOUANIA (2008-2010). Conduite optimale des procédés alimentaires: application à la lyophilisation de bactéries lactiques.

Directeur de thèse: Cristian Tréléa, Pr AgroParisTech

Taux d'encadrement: 33 % (co-encadrement avec Cristian Tréléa et Fernanda Fonseca, DR INRA)

Implication: Définition du projet de thèse, des questions de recherche et de la démarche scientifique, suivi régulier des résultats expérimentaux.

1 article accepté

LISTES DES PUBLICATIONS ORDONNEES PAR TYPE

ARTICLES DANS DES PERIODIQUES A COMITE DE LECTURE:

1. Scutella, B., I. C. Trelea, E. Bourles, F. Fonseca, and **S. Passot**. 2018. Determination of the dried product resistance variability and its influence on the product temperature in pharmaceutical freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 128:379-388.
2. Scutella, B., E. Bourles, A. Plana-Fattori, F. Fonseca, D. Flick, I.-C. Trelea, and **S. Passot**. 2018. Effect of Freeze Dryer Design on Heat Transfer Variability Investigated Using a 3D Mathematical Model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107:2098-2106.
3. Penicaud, C., V. Monclus, B. Perret, **S. Passot**, and F. Fonseca. 2018. Life cycle assessment of the production of stabilized lactic acid bacteria for the environmentally-friendly preservation of living cells. *Journal of Cleaner Production* 184:847-858.
4. Aceves Lara, C. A., V. Athès, P. Buche, G. Della Valle, V. Farines, F. Fonseca, V. Guillard, K. Kansou, M. Kristiawan, V. Monclus, J.-R. Mouret, A. Ndiaye, P. Neveu, **S. Passot**, C. Pénicaut, J.-M. Sablayrolles, J.-M. Salmon, R. Thomopoulos, and I. C. Trelea. 2018. The virtual food system: Innovative models and experiential feedback in technologies for winemaking, the cereals chain, food packaging and eco-designed starter production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 46:54-64.
5. Deuscher, Z., J.-M. Bonny, F. Boué, V. Cheynier, S. Clerjon, M.-F. Devaux, J. Meneghel, F. Guillon, F. Jamme, S. Le Feunteun, **S. Passot**, M. Réfrégiers, H. Rogniaux, D. Ropartz, J. Thévenot, A. Vallverdu-Queralt, and F. Canon. 2018. Selected case studies presenting advanced methodologies to study food and chemical industry materials: From the structural characterization of raw materials to the multisensory integration of food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 46:29-40.
6. Meneghel, J., **S. Passot**, S. Cenard, M. Refregiers, F. Jamme, and F. Fonseca. 2017. Subcellular membrane fluidity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* under cold and osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:6907-6917.
7. Meneghel, J., **S. Passot**, S. Dupont, and F. Fonseca. 2017. Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation. *Applied microbiology and biotechnology* 101:1427-1441.
8. Scutellà, B., **S. Passot**, E. Bourles, F. Fonseca, and I. C. Trelea. 2017. How Vial Geometry Variability Influences Heat Transfer and Product Temperature During Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106:770-778.
9. Scutellà, B., A. Plana-Fattori, **S. Passot**, E. Bourles, F. Fonseca, D. Flick, and I. C. Trelea. 2017. 3D mathematical modelling to understand atypical heat transfer observed in vial freeze-drying. *Applied Thermal Engineering* 126:226-236.
10. Nguyen, T. D., S. Guyot, C. Penicaud, **S. Passot**, C. Sandt, F. Fonseca, R. Saurel, and F. Husson. 2017. Understanding the responses of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during dehydration processes using synchrotron infrared spectroscopy. *Analyst* 142:3620-3628.
11. Fonseca, F., J. Meneghel, S. Cenard, **S. Passot**, and G. J. Morris. 2016. Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular micro-organisms under conditions relevant for cryopreservation. *Plos One* 11:1-19.
12. Meneghel, J., E. Dugat-Bony, F. Irlinger, V. Loux, M. Vidal, **S. Passot**, C. Béal, S. Layec, and F. Fonseca. 2016. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1, a Lactic Acid Bacterium Isolated from French Handcrafted Fermented Milk. *Genome Announcements* 4:1-2.
13. Trelea, I. C., F. Fonseca, and **S. Passot**. 2016. Dynamic Modelling of the Secondary Drying Stage of Freeze-Drying Reveals Distinct Desorption Kinetics for Bound Water. *Drying Technology* 34:335-345.
14. Trelea, I. C., F. Fonseca, **S. Passot**, and D. Flick. 2015. A Binary Gas Transport Model Improves the Prediction of Mass Transfer in Freeze-Drying. *Drying Technology* 33:1849-1858.
15. **Passot, S.**, J. Gautier, F. Jamme, S. Cenard, P. Dumas, and F. Fonseca. 2015. Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Analyst* 140:5920-5928.
16. Velly, H., M. Bouix, **S. Passot**, C. Penicaud, H. Beinstainer, S. Ghorbal, P. Lieben, and F. Fonseca. 2015. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* TOMSC161. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:907-918.
17. Velly, H., F. Fonseca, **S. Passot**, A. Delacroix-Buchet, and M. Bouix. 2014. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology* 117:729-740.

18. **Passot, S.**, F. Jamme, M. Réfrégiers, J. Gautier, S. Cenard, and F. Fonseca. **2014**. Synchrotron UV fluorescence microscopy for determining membrane fluidity modification of single bacteria with temperatures. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 3:203-210.
19. Fiches, G., I. Deleris, A. Saint-Eve, **S. Passot**, P. Brunerie, and I. Souchon. **2014**. Influence of the Nonvolatile Fraction on the Sensory Perception of 40% (V/V) Ethanol-Containing French Grape Brandies. *Journal of Sensory Studies* 29:56-63.
20. Gautier, J., **S. Passot**, C. Penicaud, H. Guillemain, S. Cenard, P. Lieben, and F. Fonseca. **2013**. A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of Dairy Science* 96:5591-5602.
21. **Passot, S.**, S. Cenard, I. Douania, I. C. Trelea, and F. Fonseca. **2012**. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 132:1699-1705.
22. Antelo, L. T., **S. Passot**, F. Fonseca, I. C. Trelea, and A. A. Alonso. **2012**. Toward Optimal Operation Conditions of Freeze-Drying Processes via a Multilevel Approach. *Drying Technology* 30:1432-1448.
23. **Passot, S.**, I. C. Tréléa, M. Marin, M. Galan, G. J. Morris, and F. Fonseca. **2009**. Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer. *Journal of Biomechanical Engineering* 131:0745111-5.
24. Tréléa, I. C., **S. Passot**, M. Marin, and F. Fonseca. **2009**. Model for heat and mass transfer in freeze-drying pellets. *Journal of Biomechanical Engineering* 131:0745011-7.
25. **Passot, S.**, F. Fonseca, N. Barbouche, M. Alarcon-Lorca, D. Rolland, M. Rapaud, and M. Marin. **2007**. Effect of product temperature applied during primary drying on the long-term stability of lyophilized proteins. *Pharmaceutical Development and Technology* 12:543-553.
26. Tréléa, I. C., **S. Passot**, F. Fonseca, and M. Marin. **2007**. An interactive tool for freeze-drying cycle optimization including quality criteria. *Drying Technology* 25:471-751.
27. **Passot, S.**, F. Fonseca, M. Alarcon-Lorca, D. Rolland, and M. Marin. **2005**. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60:335-348.
28. Oldenhof, H., W. F. Wolkers, F. Fonseca, **S. Passot**, and M. Marin. **2005**. Effect of Sucrose and Maltodextrin on the Physical Properties and Survival of Air-Dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Biotechnology Progress* 21:885 - 892.
29. Fonseca, F., **S. Passot**, O. Cunin, and M. Marin. **2004**. Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnology Progress* 20:229-238.
30. Fonseca, F., **S. Passot**, P. Lieben, and M. Marin. **2004**. Collapse temperature of bacterial suspensions: the effect of cell type and concentration. *Cryo-Letters* 25:425-434.

CHAPITRES D'OUVRAGE

1. Fonseca, F., S. Cenard, and **S. Passot**. **2015**. Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria, p. 509. In W. F. Wolkers and H. Oldenhof (ed.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, vol. 1257. Springer-Verlag, New York.
2. **Passot, S.**, I. C. Tréléa, M. Marin, and F. Fonseca. **2010**. The relevance of thermal properties for improving formulation and cycle development: Application to freeze-drying of proteins. In L. Rey and J. C. May (ed.), *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and biological Products*, 3rd Edition ed. Informa Healthcare USA Inc., New York.
3. Marin, M., **S. Passot**, F. Fonseca, and I. C. Tréléa. **2009**. Optimization of freeze-drying process applied to food and biological products: From response surface methodologies to an interactive tool. In F. Erdoglu (ed.), *Optimization in food engineering*. CRC Press, Boca Raton.

CONFERENCES INVITEES

1. **Passot, S.**, and F. Fonseca. **2017**. The challenges for freeze-drying complex biological systems: State of the art and future. Presented at the 8th International Conference of Lyophilization and Freeze-Drying, La Habana, Cuba, 24th-28th April.
2. **Passot, S.**, F. Jamme, M. Réfrégiers, J. Meneghel, P. Dumas, and F. Fonseca. **2017**. Les bactéries lactiques sous la lumière du synchrotron pour comprendre les mécanismes de cryotolérance. Presented at the Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Paris, France, 9-11 October.

3. **Irlinger, F.**, W. Cao, T. Cattenoz, M. N. Leclercq-Perlat, **S. Passot**, and F. Fonseca. **2017**. Stabilisation d'un écosystème fromager simplifié par congélation et lyophilisation. Presented at the Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Paris, France, 9th-11th October.
4. **Scutellà, B.**, E. Bourles, F. Fonseca, A. Plana Fattori, D. Flick, I. C. Tréléa, and **S. Passot**. **2016**. How to manage scale-up using design space approach. Presented at the PDA Europe, Pharmaceutical Freeze Drying Technology, Strasbourg, France, 27-28 September.
5. **Passot, S.**, I. C. Tréléa, S. Cenard, and F. Fonseca. **2015**. Freeze-drying of bacteria: State of the art and new perspectives. Presented at the 7th International Conference of Lyophilization and Freeze-Drying, Barcelona, Spain, 8th-10th July.
6. **Passot, S.**, H. Velly, C. Penicaud, P. Lieben, S. Ghorbal, M. Bouix, and F. Fonseca. **2015**. Strategies for improving freeze-drying resistance of bacteria: Modulating membrane properties during fermentation. Presented at the 52th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic, 26th-29th July.
7. **Fonseca, F.**, **S. Passot**, J. Meneghel, S. Cenard, P. Dumas, and G. J. Morris. **2015**. Towards a better understanding of cryotolerance mechanisms in bacteria. Presented at the 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic, 26-29 July.
8. **Passot, S.**, F. Fonseca, S. Cenard, and I. C. Tréléa. **2014**. Freeze-drying modeling: Prediction of spatial distribution of product quality. Presented at the The Freeze Drying of Pharmaceuticals and Biologicals Conference, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 23th-26th September.
9. **Passot, S.**, and F. Fonseca. **2014**. Lyophilisation: Impact sur la valeur nutritionnelle des aliments. Presented at the Journées d'étude de l'Association Française des Diététiciens et Nutritionnistes, Marseille, France, 5-7 June.
10. **Passot, S.**, F. Jamme, M. Refregiers, S. Cenard, and F. Fonseca. **2013**. Towards the in situ study of bacterial single cells following freeze-drying using synchrotron radiation. Presented at the 6th International Conference of Lyophilization and Freeze-Drying, Sao Paulo, Bresil, 1st-4th October.
11. **Passot, S.**, and F. Fonseca. **2013**. An evaluation of the advantages and disadvantages of controlling ice nucleation in the lyophilisation process. Presented at the SMi Inaugural Meeting on Lyophilisation: Freeze-Drying in Pharmaceuticals and Biopharmaceutical, London, UK, 25th-26th February.
12. **Fonseca, F.**, I. C. Tréléa, and **S. Passot**. **2013**. Controlling ice nucleation: the Pros & the Cons. Presented at the PDA International Conference of Lyophilization and Freeze-drying, Dusseldorf, Germany, 23-24 October.
13. **Passot, S.**, F. Fonseca, S. Cenard, I. C. Tréléa, C. Vilas, E. Balsa Cantos, and A. Alonso. **2012**. Developing smart control strategies of freeze-drying of lactic acid bacteria. Presented at the 5th International Conference of Lyophilization and Freeze-Drying, Bologne, Italy, 29th-30th March.
14. **Passot, S.**, I. Douania, S. Cenard, F. Fonseca, and I. C. Tréléa. **2010**. Modeling for risk assessment of quality failures: Application to microorganisms. Presented at the The Freeze Drying of Pharmaceuticals and Biologicals Conference, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 28th September -1st October.
15. **Passot, S.**, I. C. Tréléa, and F. Fonseca. **2009**. Computer modelling to optimise freeze-drying cycles. Presented at the Visiongain's 2nd Annual Lyophilisation Conference, London, UK, 15th-17th September.
16. **Béal, C.**, G. Corrieu, F. Fonseca, **S. Passot**, A. Rault, M. Servaes, F. Streit, and Y. Wang. **2009**. Cryotolerance is influenced by passive and active responses of lactic acid bacteria Presented at the Society for general Microbiology SGM Meeting, Edinburgh, United Kingdom 7th-9th September.
17. **Fonseca, F.**, S. Cenard, I. C. Tréléa, M. Marin, and **S. Passot**. **2009**. Stabilization of lactic acid bacteria: Relevance of physical properties on formulation and process efficiency. Presented at the X Congreso Latinoamericano de Microbiología et Higiene de los Alimentos, Punta del Este, Uruguay, 4th-7th October.
18. **Passot, S.**, F. Fonseca, M. Marin, and I. C. Tréléa. **2008**. User-friendly modeling of the freeze-drying process. Presented at the The Freeze Drying of Pharmaceuticals and Biologicals Conference, Breckenridge, Colorado, USA, 6th-9th August.
19. **Passot, S.**, F. Fonseca, I. C. Tréléa, and M. Marin. **2008**. Impact of thermal properties on protein formulation and freeze-drying cycle development. Presented at the ISPE Conference on Manufacturing Excellence 2008. Lyophilization: Meeting the Challenges of a Critical Technology, Tempa, Florida, USA, 26th-27th February.
20. **Passot, S.**, I. C. Tréléa, S. Cenard, and F. Fonseca. **2008**. Freezing: A critical step for freeze-drying cycle development and product stability. Presented at the ISPE Conference - Lyophilisation: Scientific issues of the process and introduction to a risk-based approach, Barcelona, Spain, 2nd-4th December.
21. **Passot, S.**, M. Marin, I. C. Tréléa, and F. Fonseca. **2008**. Quality by design approach: The particular case of freeze-drying process. Presented at the 2008 PDA Conference on Quality by Design, Frankfurt, Germany, 7th-8th October.

22. **Passot, S.**, F. Fonseca, and M. Marin. **2007**. Impact of thermal properties on formulation and on freeze-drying development. Presented at the New ventures in freeze-drying, Strasbourg, France, 8th-9th November.
23. **Passot, S.**, F. Fonseca, I. C. Trélea, and M. Marin. **2007**. Impact of freezing, especially the controlled nucleation on protein freeze-drying efficiency. Presented at the Informa Life Sciences. Lyophilization of Pharmaceuticals, London, UK, 3rd-5th December.
24. **Trélea, I. C.**, **S. Passot**, F. Fonseca, and M. Marin. **2007**. An interactive tool for freeze-drying cycle optimisation based on product quality criteria. Presented at the Informa Life Sciences. Lyophilization of Pharmaceuticals, London, UK, 3rd-5th December.
25. **Fonseca, F.**, **S. Passot**, S. Cenard, I. C. Trélea, and M. Marin. **2007**. Stabilisation of lactic acid bacteria: relevance of physical properties on formulation efficiency. Presented at the 1st Int. DOM Symposium on Microbial Formulation, Uppsala, Sweden, 4th-5th December.
26. **Fonseca, F.**, **S. Passot**, I. C. Trélea, and M. Marin. **2006**. Impact of physical properties of bioproducts on formulation and freeze-drying cycle development. Presented at the International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE). Lyophilization Technologies and Practice Seminar, Vienna, Austria, 18th-19th September
27. **Fonseca, F.**, **S. Passot**, and M. Marin. **2005**. Physical properties of frozen and freeze-dried starters: Impact on process conditions and formulation efficiency. Presented at the Minisymposium on Antifungal lactic acid and propionic acid bacteria, Uppsala, Sweden, 11th-12th May.
28. **Passot, S.**, F. Fonseca, I. C. Trélea, and M. Marin. **2004**. Examining the current status of Process Analytical Technology applied to lyophilization: Instrumentation, kinetics, quality criteria and risks area in the cycle. Presented at the Barnett International's Annual Conference on Freeze-drying, Dublin, Ireland, 28th-29th June.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES SCIENTIFIQUES INTERNATIONAUX

1. **Scutellà, B.**, E. Bourlès, C. Tordjman, F. Fonseca, Y. Mayeresse, I. C. Trelea, and **S. Passot**. **2017**. Can the desorption kinetics explain the residual moisture content heterogeneity observed in pharmaceuticals freeze-drying process? Presented at the EuroDrying'2017, 6th European Drying Conference, Liège, Belgium, 19th-21st June.
2. **Pénicaud, C.**, V. Monclus, B. Perret, **S. Passot**, and F. Fonseca. **2016**. Production of Stabilized Lactic Acid Bacteria viewed from a Life Cycle Assessment perspective Presented at the Icafood2016, Dublin, Ireland, 19th – 21st October.
3. **Pénicaud, C.**, I. C. Trélea, B. Perret, F. Fonseca, and **S. Passot**. **2016**. Freeze-drying control by taking into account environmental considerations. Presented at the FoodFactory, Laval, France, 19-21 October.
4. **Meneghel, J.**, **S. Passot**, S. Cenard, J. Xu, M. Refregiers, F. Jamme, and F. Fonseca. **2015**. Mapping membrane fluidity by fluorescence anisotropy to better understand bacterial tolerance to osmotic and cold stresses encountered during freezing. Presented at the 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic, 26-29 July.
5. **Meneghel, J.**, **S. Passot**, F. Jamme, M. Réfrégiers, S. Cenard, J. Xu, P. Dumas, and F. Fonseca. **2015**. Dynamic characterization of membrane biophysical properties to better understand bacterial tolerance to osmotic and cold stresses encountered during freezing. Presented at the Microbial stress: From molecules to systems, Sitges, Spain, 12-15 November.
6. **Meneghel, J.**, J. Xu, S. Cenard, G. Sockalingum, **S. Passot**, P. Dumas, and F. Fonseca. **2015**. Using Raman spectroscopy to understand the osmotic stress response of lactic acid bacteria. Presented at the XXIèmes journées du Groupe Français de Spectroscopies Vibratoires (GFSV), Reims, France, 17-19 June.
7. **Fonseca, F.**, J. Meneghel, S. Cenard, **S. Passot**, D. Gilham, V. Sheard, and **G. J. Morris**. **2015**. Initial measurement of the intracellular glass transition of a mammalian cell type under cryopreservation conditions. Presented at the 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic, 26-29 July.
8. **Passot, S.**, F. Fonseca, J. Skepper, and G. J. Morris. **2014**. How to increase freeze-drying recovery of biological products by manipulating the ice crystal morphology. Presented at the 45th Annual Conference of the British Association for Crystal Growth, Leeds, UK, 13-15 July.
9. **Trélea, I. C.**, F. Fonseca, **S. Passot**, and D. Flick. **2014**. A mutual gas diffusion model improves the prediction of mass transfer in freeze-drying. Presented at the 9th International Drying Symposium, Lyon, France, 24-27 August.
10. **Passot, S.**, F. Jamme, M. Réfrégiers, J. Gautier, S. Cenard, and F. Fonseca. **2013**. Towards the measurement of membrane fluidity at subzero temperatures for improving cell cryopreservation. Presented at the European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM 15), Oxford, UK, 25-30 August.

11. Velly, H., F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, **S. Passot**, and M. Bouix. **2013**. Propriétés de la membrane et résistance à la lyophilisation de ferments lactiques : Intérêt de la mesure de fluidité membranaire par cytométrie en flux. Presented at the 17e Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie, Strasbourg, France, 16-18 October.
12. **Passot, S.**, F. Fonseca, S. Cenard, C. Vilas, E. Balsa Canto, A. Alonso, and I. C. Tréléa. **2012**. Developing Smart Control Strategies for the Freeze-Drying of Bacteria. Presented at the EFFoST Annual Meeting, Montpellier, France, 20-23 November.
13. **Passot, S.**, C. Vilas, F. Fonseca, S. Cenard, E. Balsa Canto, A. Alonso, and I. C. Tréléa. **2012**. Real time optimization of freeze-drying of lactic acid bacteria. Presented at the 5th International Symposium on Spray Dried Dairy Products, Saint-Malo, France, 19-21 June.
14. Gautier, J., **S. Passot**, F. Jamme, S. Cenard, and F. Fonseca. **2012**. Using Synchrotron infrared microspectroscopy to better understand the freezing-resistance of lactic acid bacteria. Presented at the 49th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina, 2-6 June.
15. **Passot, S.**, S. Cenard, I. C. Tréléa, and F. Fonseca. **2011**. Freeze-drying of lactic acid bacteria: Effect of process variables on cell injury. Presented at the 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Corvallis, Oregon, USA, 24-27 July.
16. **Passot, S.**, F. Fonseca, F. Brothier, and S. Bouhallab. **2011**. The physical behavior of food protein's supramolecular structure during freeze-drying. Presented at the ICEF 11, International Congress of Engineering and Food, Athens, Greece, 22-26 May.
17. **Passot, S.**, F. Fonseca, S. Cenard, I. Douania, and I. C. Tréléa. **2011**. Quality degradation of lactic acid bacteria during the freeze drying process: Experimental study and mathematical modelling. Presented at the ICEF 11, International Congress of Engineering and Food, Athens, Greece, 22-26 May.
18. Capuano, R., M. Santonico, E. Martinelli, R. Paolesse, **S. Passot**, F. Fonseca, S. Cenard, C. Trelea, and C. Di Natale. **2011**. Electronic Nose Characterization of the Quality Parameters of Freeze-Dried Bacteria. Presented at the 14th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose, New York, 02-05 May.
19. Fonseca, F., J. Gautier, S. Cenard, **S. Passot**, F. Jamme, and P. Dumas. **2011**. Probing Live Cellular Responses to freezing by Infrared Spectromicroscopy. Presented at the CellNanoSpec, Porquerolles, France, 11-14 September.
20. **Passot, S.**, A. Rault, S. Cenard, and F. Fonseca. **2010**. Cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: towards a quantitative understanding of the cell biophysical response during freezing. Presented at the 47th Annual meeting of the Society for Cryobiology, Bristol, UK, 17th-20th July.
21. **Passot, S.**, S. Cenard, I. C. Tréléa, I. Douania, and F. Fonseca. **2010**. Water in freeze-dried lactic acid bacteria: Friend or Foe. Presented at the EuroFoodWater, Reims, France, 22th -23th March.
22. **Passot, S.**, F. Fonseca, and I. C. Tréléa. **2009**. Lyophilisation of pellets: Experimental and modelling study. Presented at the AFSIA-EFCE Drying Conference, Lyon, France, 14th-15th May.
23. **Passot, S.**, F. Fonseca, M. Marin, and I. C. Tréléa. **2008**. Vacuum freeze-drying of food pellets: Experimental study and mathematical modelling Presented at the ICEF 10 - International Congress on Engineering and Food, Vina del Mar, Chili, 20th-24th April.
24. Fonseca, F., **S. Passot**, S. Cenard, I. C. Tréléa, M. Marin, and J. G. Morris. **2008**. Stabilization of freeze-dried *Lb Bulgaricus* cells: the freezing kinetics effect. Presented at the Annual meeting of the Society for Cryobiology, Charlotte, North Carolina, USA, 20th-23th July.
25. Fonseca, F., **S. Passot**, S. Cenard, M. Marin, and G. J. Morris. **2007**. The glassy state of the freeze-concentrated medium formed during freezing: effects on cryopreservation of *Lb. bulgaricus* cells. Presented at the Annual meeting of the Society for Cryobiology, Lake Louise, Alberta, Canada, 27th July - 2nd August.
26. **Passot, S.**, F. Fonseca, I. C. Trelea, A. Remillieux, M. Galan, G. J. Morris, and M. Marin. **2007**. Controlled nucleation improves the efficiency pharmaceutical proteins lyophilization. Presented at the AFSIA / EFCE Drying Conference, Biarritz, France, 24th-25th May.
27. **Passot, S.**, I. C. Tréléa, F. Fonseca, N. Barbouche, and M. Marin. **2006**. Integration of glass transition in freeze-drying kinetic modelling to improve protein stability. Presented at the 13th World Congress of Food Science and Technology "Food is Life", IUFOST XIIIth Congress, Nantes, France, 17th-21th September.
28. **Passot, S.**, F. Fonseca, and M. Marin. **2006**. Physical and biological stability of freeze-dried polymer-sucrose protein formulations related to water activity. Presented at the Amorph 2006, Cambridge, UK, 10th-12th July.
29. Fonseca, F., **S. Passot**, M. Marin, and G. J. Morris. **2006**. Cryopreservation of lactic acid bacteria: Effect of linear cooling rates. Presented at the Annual meeting of the Society for Cryobiology, Hamburg, Germany, 24th-27th July.

30. Tréléa, I. C., S. Passot, F. Fonseca, and M. Marin. **2005**. An interactive tool for freeze-drying cycle optimization based on product quality criteria. Presented at the AFSIA / EFCE Drying Conference, Paris, France, 12th-13th May.
31. Fonseca, F., S. Passot, and M. Marin. **2004**. An effective property for the formulation of a freeze-dried food ingredient: Glass transition or Collapse ? . Presented at the ICEF 9 - International Congress on Engineering and Food, Montpellier, France, 7th-11th March.
32. Fonseca, F., S. Passot, and M. Marin. **2003**. Collapse temperature of bacterial suspensions: Effect of cell concentration. Presented at the Meeting of the National Institute of Biological Standards, London, UK, 3-5 September.

POSTERS

1. Cao, W., F. Irlinger, T. Cattenoz, M. N. Leclercq-Perlat, S. Passot, and F. Fonseca. **2017**. Preservation of a smear surface-ripened cheese ecosystem by freezing and freeze-drying: A proof of concept. Presented at the FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologists, Valencia, Spain, 6th-13th July.
2. Scutella, B., S. Passot, E. Bourlès, F. Fonseca, A. Plana-Fattori, D. Flick, and I. C. Tréléa. **2016**. Finite elements model of heat transfer predicts the edge vial effect in different freeze-drying configurations. Presented at the 2016 CPPR Freeze Drying of Pharmaceuticals & Biologicals, Breckenridge, Colorado, USA, 12-15 July.
3. Scutella, B., S. Passot, E. Bourlès, F. Fonseca, and I. C. Tréléa. **2015**. Inter-vial heat heterogeneity during freeze-drying: Role of vial geometry and position on the shelf. Presented at the 7th International Conference of Lyophilization and Freeze-Drying (ISL-FD), Barcelona, Spain, 8th-10th July.
4. Meneghel, J., S. Lefrançois, S. Passot, F. Jamme, F. Fonseca, and P. Dumas. **2015**. Challenges underlying the in situ analysis of single bacterial cells by synchrotron FTIR spectromicroscopy. Presented at the European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM 16), Bochum, Germany, 6-10 September.
5. Meneghel, J., J. Xu, F. Jamme, S. Passot, P. Dumas, and F. Fonseca. **2015**. Dynamic characterization of membrane biophysical properties is crucial for improving the tolerance of lactic acid bacteria to osmotic and cold stresses encountered during freezing. Presented at the XXIèmes journées du Groupe Français de Spectroscopies Vibratoires (GFSV), Reims, France, 17-19 June.
6. Monclus, V., C. Pénicaut, B. Perret, S. Passot, and F. Fonseca. **2015**. Life Cycle Assessment for an Eco-Friendly Management of the Production of Stabilized Microorganisms. Presented at the Life Cycle Management 2015, Bordeaux, France, 30 August - 2 September.
7. Passot, S., G. J. Morris, S. Cenard, J. Skepper, and F. Fonseca. **2014**. How to increase freeze-drying recovery of biologicals by manipulating the ice crystal morphology. Presented at the The Freeze Drying of Pharmaceuticals and Biologicals Conference, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 23th-26th September.
8. Pénicaut, C., I. C. Tréléa, B. Perret, F. Fonseca, V. Athès, and S. Passot. **2014**. Insights into freeze-drying energy consumptions for an environmentally-reasoned process control. Presented at the 4th International Congress on Green Process Engineering, Sevilla, Spain, 7-10 April.
9. Velly, H., F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, S. Passot, and M. Bouix. **2013**. Influence of fermentation conditions on the survival and acidifying activity of freeze-dried *Lactococcus lactis*. Presented at the 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, 21-25 July.
10. Pénicaut, C., T. Maury, S. Passot, B. Perret, and F. Fonseca. **2013**. Analyse environnementale de procédés bio-industriels. Presented at the XIVe Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), Lyon, France, 8-10 October.
11. Passot, S., M. Bouix, J. Gautier, P. Lieben, S. Cenard, S. Ghorbal, and F. Fonseca. **2012**. Relevance of cell biophysical behaviour and membrane fluidity for explaining freezing resistance of lactic acid bacteria. Presented at the 49th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina, 2-6 June.
12. Passot, S., J. Gautier, C. Pénicaut, F. Jamme, S. Cenard, P. Lieben, and F. Fonseca. **2012**. Towards a better understanding of the freezing resistance of lactic acid bacteria. Presented at the Dijon Domains 2012, International Conference on Membrane Domains, Dijon, France, 27-30 November.
13. Gautier, J., S. Passot, S. Cenard, C. Pénicaut, P. Lieben, F. Jamme, and F. Fonseca. **2012**. Influence of membrane phase behaviour and lipid composition on freezing-resistance of lactic acid bacteria. Presented at the Faraday Discussion 161: Lipids and Membrane Biophysics, London, UK, 11-13 September.
14. Velly, H., F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, S. Passot, and M. Bouix. **2012**. Amélioration de la résistance à la lyophilisation de *Lactococcus lactis* par la modulation des paramètres de fermentation. Presented at the Journées des Microbiologistes de l'INRA, L'Isle-sur-la-Sorgue, France, 13-15 November.

15. Nolli, A., F. Fonseca, S. Bouhallab, and S. Passot. **2009**. Study of the stability of proteins' microparticles during lyophilization. (Poster + 2 pages) Presented at the AFSIA-EFCE Drying Conference, Lyon, France, 14th-15th May.
16. Passot, S., F. Fonseca, and M. Marin. **2006**. Effect of primary drying above Tg' on the long term stability of freeze-dried proteins. (poster). Presented at the Amorph 2006, Cambridge, UK, 10-12 July.

BREVETS

1. Passot, S., F. Fonseca, and Marin, M. **2005**. Compositions pour la lyophilisation de protéines. French patent: 05 00791.

LISTE DES PROJETS ET CONTRATS EN PRECISANT LA NATURE, L'IMPLICATION ET LES RESPONSABILITES

CONTRATS INSTITUTIONNELS SUR FINANCEMENT PUBLIC

1. Projet européen 7ème PCRD (2008-2013): CAFE Computer-aided food processes for control engineering (Grant 212754)

Projet coordonné par l'Université Catholique de Louvain regroupant 16 partenaires (8 partenaires publics: Université catholique de Louvain, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA - UMR SPO), Spanish Council for Scientific Research, AgroParisTech, University of Rome Tor Vergata, Wageningen University and Research Centre, University of Manchester, Cemagref et 8 partenaires privés: Telstar, Povltavske Mlekarny, Società di Progettazione Elettronica e Software, C-Tech Innovation, Alctra, Norit X-Flow, BIV Trace, PSUTec)

Implication et responsabilités

Participation au montage du projet, recherche de partenaires

Responsable scientifique du cas d'étude sur la lyophilisation de bactéries lactiques

Réalisation et suivi du projet: définition des essais, interprétation des résultats, rédaction et relecture des livrables et rapports pour la Commission européenne.

Co-encadrement d'une thèse:

Ines DOUANIA (2008-2010). Conduite optimale des procédés alimentaires: application à la lyophilisation de bactéries lactiques. Encadrement: 33 %. Arrêt de la thèse en fin de 2ème année.

2. Projet ANR AlimIntest (2007-2010): Effet de régimes alimentaires contrôlés sur la dynamique structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal humain.

Projet coordonné par Libragen regroupant 8 partenaires: Libragen, CRNH Rhône-Alpes - CHU de Grenoble, AgroParisTech, INRA-Micalis, Ecole Centrale de Lyon, INSAT, Centre National de Séquençage, Université Grenoble 1.

Implication et responsabilités

Responsable scientifique et technique d'AgroParisTech

Coordination de la sous-tâche concernant la préparation de rations alimentaires lyophilisées

3. Projet ANR Laclys (2008-2011): Elaboration de microstructures à partir de protéines alimentaires: mécanismes et propriétés

Projet coordonné par l'INRA (UMR STLO) regroupant 4 partenaires: INRA (UMR STLO), CEA Grenoble (LCEM), AgroParisTech (UMR GMPA), CNRS Rennes (GMCM).

Implication et responsabilités

Responsable scientifique et technique d'AgroParisTech

Coordination de la tâche dédiée à l'étude de la stabilité des microstructures protéines soumises à des procédés de congélation et lyophilisation.

Participation au montage et à la réalisation du projet: définition des essais, interprétation des résultats (encadrement de 3 stages)

4. Projet OSEO (2011-2013): Amélioration du procédé de préparation de concentrés lyophilisés de bactéries lactiques (suite d'un contrat industriel avec Naturatech).

Projet coordonnée par l'INRA (UMR GMPA) impliquant 2 partenaires, l'INRA et la société Bioprox.

Implication et responsabilités

Responsable scientifique du projet

Participation au montage, à la coordination, réalisation du projet et à l'interprétation des résultats

1. ANS Minnesota (2008-2010): Congélation des bioproduits: Biotransferts (mécanismes et modélisation)

ANS établie en collaboration avec l'Université du Minnesota (Department of Mechanical Engineering, Equipe du Pr J.C. Bishof)

Implication et responsabilités

Participation à la réalisation du projet: définition, réalisation des essais et interprétation des résultats
Réalisation d'un séjour de 2 mois à l'Université du Minnesota

2. ANS IRTF dynamique (2010-2012): Etude in situ par microspectroscopie infrarouge du comportement biophysique des bactéries lactiques lors des procédés de congélation/décongélation et déshydratation

ANS établie en collaboration avec la ligne de lumière SMIS du synchrotron SOLEIL (F. Jamme, INRA Nantes)

Implication et responsabilités

Porteur de l'ANS

Montage de l'ANS, définition des objectifs de recherche, définition des essais à réaliser et participation à sa réalisation et à l'interprétation des résultats (2 appels à projet sur la ligne SMIS)

3. ANS LyOxyBac (2014-2016): Identification de marqueurs d'oxydation lors de la production de bactéries lactiques lyophilisées

ANS établie en collaboration avec l'ENS d'Ulm (Laboratoire de BioMolécules, Equipe du Pr C. Policar)

Implication et responsabilités

Porteur de l'ANS

Montage de l'ANS, définition des objectifs de recherche, définition des essais à réaliser et participation à sa réalisation et à l'interprétation des résultats (Encadrement de 2 stages de 6 mois)

4. AIC MOLI (2016-2018): Model Lipid Membranes of Lactic Acid Bateria

ANS établie en collaboration avec 2 UMR du Département CEPIA: BIA (Nantes), IJPB (Versailles)

Implication et responsabilités

Participation à la définition des objectifs de recherche, des essais expérimentaux et à l'exploitation des résultats.

CONTRATS INDUSTRIELS

1. Lallemand (2006-2008)

Etude de l'amélioration de la conservation, sur une durée de 12 à 24 mois, en terme de viabilité et d'activité biologique, de concentrés bactériens lyophilisés, incluant la définition de nouvelles formules et les procédés d'obtention des concentrés

Implication et responsabilités

Participation à la réalisation du projet, notamment à la définition et au suivi des essais concernant l'instrumentation et l'amélioration du procédé de lyophilisation (Encadrement d'un stage de 6 mois)

2. L'Oréal (2006-2007)

Lyophilisation du plancton thermal et définition de formules cryoprotectrices adaptées afin d'en optimiser l'intérêt en cosmétique

Implication et responsabilités

Participation au montage (définition des objectifs scientifiques et du programme d'essais expérimentaux), à la réalisation du projet et à l'interprétation des résultats

3. Sanofi-Pasteur (2008-2009)

Etude comparative de deux méthodes de détermination de la teneur en eau résiduelle de matrices pharmaceutiques lyophilisées

Implication et responsabilités

Responsable scientifique et technique du projet

Participation au montage (définition des objectifs scientifiques et du programme d'essais expérimentaux), à la réalisation du projet et à l'interprétation des résultats (encadrement d'un stage de 6 mois)

4. Naturatech (2010-2011)

Amélioration de la conservation (viabilité et activité biologique) de concentrés bactériens lyophilisés de *Lactococcus cremoris* 20137

Implication et responsabilités

Participation au montage (définition des objectifs scientifiques et du programme d'essais expérimentaux), à la réalisation du projet et à l'interprétation des résultats

5. GlaxoSmithKline (GSK) (2014-2017)

Mathematical modelling of the freeze-drying process: mechanisms responsible for product heterogeneity and scale-up risks

Implication et responsabilités

Membre du comité scientifique et technique du projet

Participation au montage (définition des objectifs scientifiques et du programme de travail), à la réalisation du projet et à l'interprétation et valorisation des résultats

Co-encadrement d'une thèse:

Bernadette SCUTELLA (2014-2017). Mathematical modelling of the freeze-drying process: mechanisms responsible for product heterogeneity and scale-up risks. Encadrement: 40 %. CDI à GlaxoSmithKline (Belgique).

AUTRES

PARTICIPATION A L'ENCADREMENT DE CONTRATS DOCTORAUX (NON MENTIONNES DANS LES CONTRATS PRECEDENTS)

Julie GAUTIER (2010-2014). Caractérisation et modélisation des mécanismes biophysiques impliqués lors de la congélation de bactéries lactiques et de leurs conséquences physiologiques. Bourse INRA (Département CEPIA). Encadrement: 50 %. Thèse non soutenue (maternité et enseignement en BTS).

Hélène VELLY (2011-2014). Etude de l'évolution de l'état physiologique de *Lactococcus lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation et de son incidence sur la résistance à la lyophilisation et au stockage. Contrat CIFRE. Encadrement: 10 %. Postdoc dans une université américaine puis CDI à l'IFPEN.

Julie MENEGHEL (2013-2017). Caractérisation *in situ* et dynamique des réponses physiologiques et biophysiques des bactéries lactiques aux stress environnementaux subis lors de leur production et de leur utilisation finale. Bourses INRA et IDEX Saclay. Encadrement: 25 %. CDI à GE Healthcare (Cambridge, UK)

Sichao ZHU (2014-début 2016). Oxidation mechanisms during lyophilization and dried storage of lactic acid bacteria. Bourse du CSC (Chinese Scholarship Council). Encadrement: 50 %. Arrêt en début de 2ème année et retour en Chine pour des raisons familiales.

Nan YANG (Novembre 2017). Study of oxidation phenomenon occurring during production of freeze-dried lactic acid bacteria and implication on cellular injuries. Bourse du CSC (Chinese Scholarship Council). Encadrement: 50 %.

PARTICIPATION A DES APPELS A PROJET DU SYNCHROTRON SOLEIL (15 PROPOSALS)

Participation au montage (définition des objectifs scientifiques et du programme de travail), à la réalisation du projet et à l'interprétation et valorisation des résultats

1. [Proposal 20100789](#). Effect of freezing on *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: in situ analysis of the cell biophysical and chemical response during freezing and thawing by infrared spectroscopy and imaging. SMIS beamline.
2. [Proposal 99110129](#). Far IR microscopy of bacterial suspensions. SMIS beamline.
3. [Proposal 20110789](#). Synchrotron UV fluorescence in situ analysis of membrane fluidity of lactic acid bacteria during freezing and thawing. DISCO beamline.
4. [Proposal 20120478](#). In situ IR microscopy analysis of biophysical responses of bacteria during freeze-drying. SMIS beamline.
5. [Proposal 20121064](#). Multimodal single cell studies of *Yarrowia lipolytica* yeast under dehydration and thermal stresses. SMIS beamline.
6. [Proposal 20131066](#). Biophysical responses of isolated bacteria to environmental stresses by using synchrotron infrared microscopy study: the first step of microfluidic approach. SMIS beamline.
7. [Proposal 20140185](#). The effect of environmental stresses during drying of encapsulated and non-encapsulated yeast: time evolved biochemical changes during the oxidation at the cell level assessed by Synchrotron IR spectroscopy analysis. SMIS beamline.
8. [Proposal 20140401](#). In-situ and heterogeneity analysis of membrane fluidity of lactic acid bacteria (LAB) exposed to various stressful treatments by using UV fluorescence polarization. DISCO beamline.
9. [Proposal 20140899](#). In situ synchrotron FTIR microspectroscopy to analyze the biophysical responses of small clusters of bacteria to hyperosmotic stress occurring during freezing. SMIS beamline.
10. [Proposal 20141082](#). DISCOmega: Linking omega 3 content and membrane fluidity in yeasts using DISCO beamline.
11. [Proposal 20150220](#). A new inverted microscope setup coupled with synchrotron ATR-FTIR spectroscopy for an in situ analysis of the response of small groups of bacterial cells to an osmotic stress encountered during freezing. SMIS beamline.
12. [Proposal 20150557](#). Effect of drying kinetics on biochemical changes of biotechnological yeast: time-evolved synchrotron IR micro-spectroscopy analysis at single-cell level. SMIS beamline.
13. [Proposal 20150869](#). DISCOmega 2: Application of DISCO beamline technical developments for membrane fluidity measurements on yeasts with Omega3 contrasted content.
14. [Proposal 20160299](#). Model biological membranes: Small, Wide-Angle X-ray Scattering, and Grazing Incidence X-ray Diffraction for better understanding of bacterial cells degradation during freezing and dehydration. SWING beamline.
15. [Proposal 20161203](#). Analysis of bacterial biochemical modifications due to production stressful conditions at the single-cell level and in an aqueous environment by coupling synchrotron FTIR spectroscopy and an inverted ATR microscope recently developed by SMIS beamline.

SELECTION DE PUBLICATIONS

Passot, S., F. Fonseca, N. Barbouche, M. Alarcon-Lorca, D. Rolland, M. Rapaud, and M. Marin. **2007**. Effect of product temperature applied during primary drying on the long-term stability of lyophilized proteins. *Pharmaceutical Development and Technology* 12:543-553.

Passot, S., I. C. Tréléa, M. Marin, M. Galan, G. J. Morris, and F. Fonseca. **2009**. Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer. *Journal of Biomechanical Engineering* 131:0745111-5.

Passot, S., S. Cenard, I. Douania, I. C. Trelea, and F. Fonseca. **2012**. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 132:1699-1705.

Gautier, J., **S. Passot**, C. Penicaud, H. Guillemain, S. Cenard, P. Lieben, and F. Fonseca. **2013**. A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of Dairy Science* 96:5591-5602.

Passot, S., F. Jamme, M. Réfrégiers, J. Gautier, S. Cenard, and F. Fonseca. **2014**. Synchrotron UV fluorescence microscopy for determining membrane fluidity modification of single bacteria with temperatures. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 3:203-210.

Passot, S., J. Gautier, F. Jamme, S. Cenard, P. Dumas, and F. Fonseca. **2015**. Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Analyst* 140:5920-5928.

Velly, H., M. Bouix, **S. Passot**, C. Penicaud, H. Beinsteiner, S. Ghorbal, P. Lieben, and F. Fonseca. **2015**. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* TOMSC161. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:907-918.

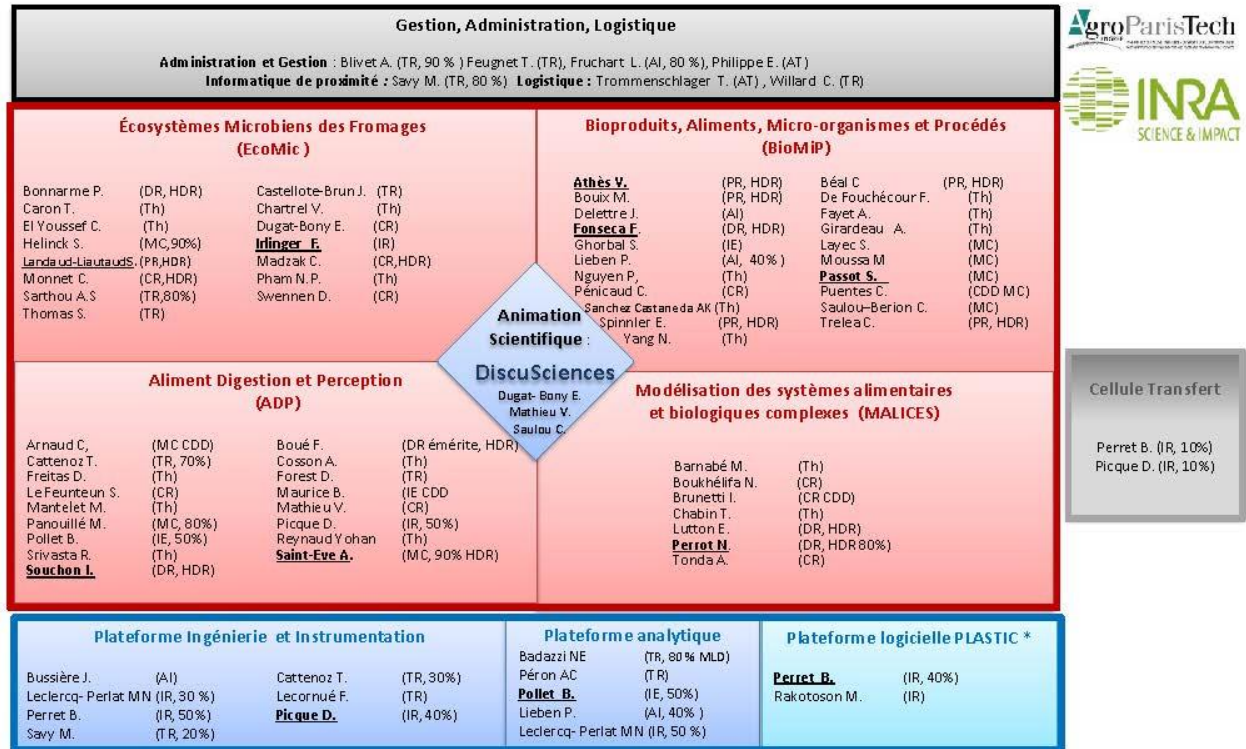
Fonseca, F., J. Meneghel, S. Cenard, **S. Passot**, and G. J. Morris. **2016**. Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular micro-organisms under conditions relevant for cryopreservation. *Plos One* 11:1-19.

Meneghel, J., **S. Passot**, S. Dupont, and F. Fonseca. **2017**. Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation. *Applied microbiology and biotechnology* 101:1427-1441.

Meneghel, J., **S. Passot**, S. Cenard, M. Refregiers, F. Jamme, and F. Fonseca. **2017**. Subcellular membrane fluidity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* under cold and osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:6907-6917.

Scutellà, B., **S. Passot**, E. Bourles, F. Fonseca, and I. C. Trelea. **2017**. How Vial Geometry Variability Influences Heat Transfer and Product Temperature During Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106:770-778.

Scutellà, B., A. Plana-Fattori, **S. Passot**, E. Bourles, F. Fonseca, D. Flick, and I. C. Trelea. **2017**. 3D mathematical modelling to understand atypical heat transfer observed in vial freeze-drying. *Applied Thermal Engineering* 126:226-236.



Effectifs : 52 permanents dont 34 scientifiques (chercheurs, enseignant-chercheurs et ingénieurs) 14 APT et 20 INRA, 18 assistants-ingénieurs & techniciens : 6 APT et 12 INRA dont 4 administratifs : 1 APT et 3 INRA, 17 thèses, 1 chercheur émérite associé, 4 CDD
 Total Collaborateurs GMPA : 73
 *Plateforme PLASTIC : Plateforme Logicielle pour l'Analyse des Signaux, leur Traitement et l'Intégration des données et des Connaissances - département CEPIA

Figure 1 : Organigramme de l'UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA)

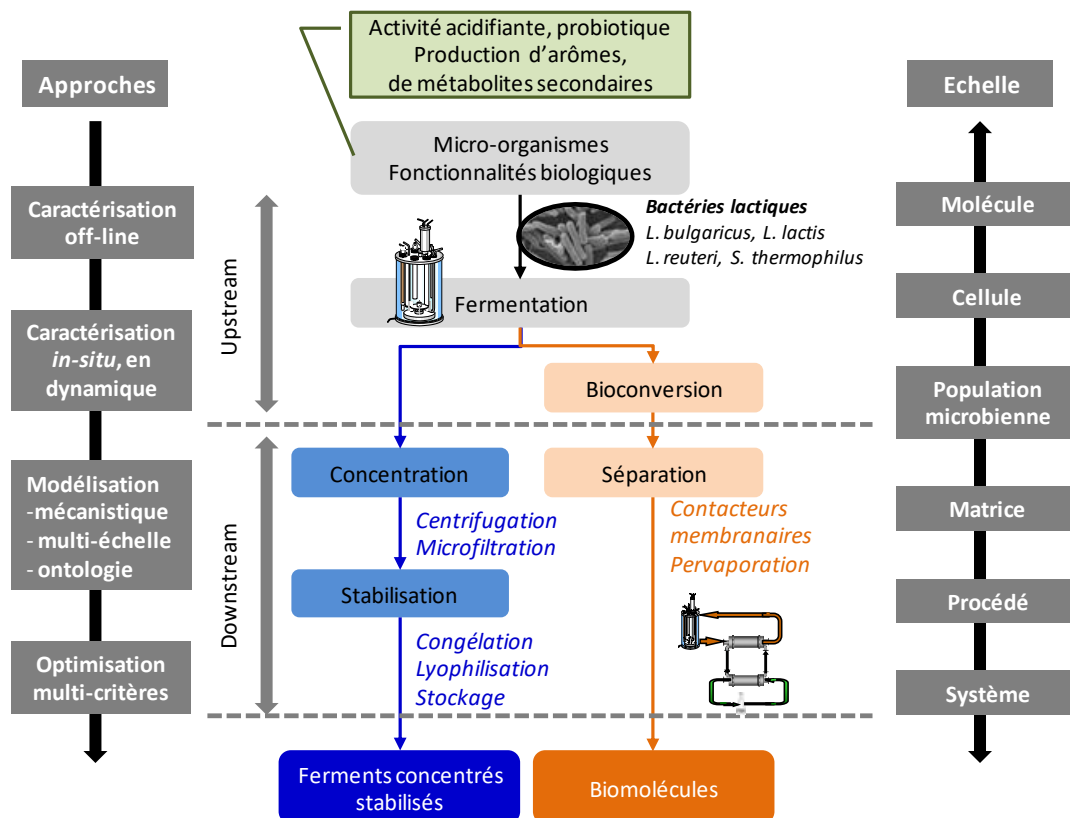


Figure 2 : Périmètre de recherche et objets d'étude de l'équipe BioMiP (Démarche et stratégie de recherche)

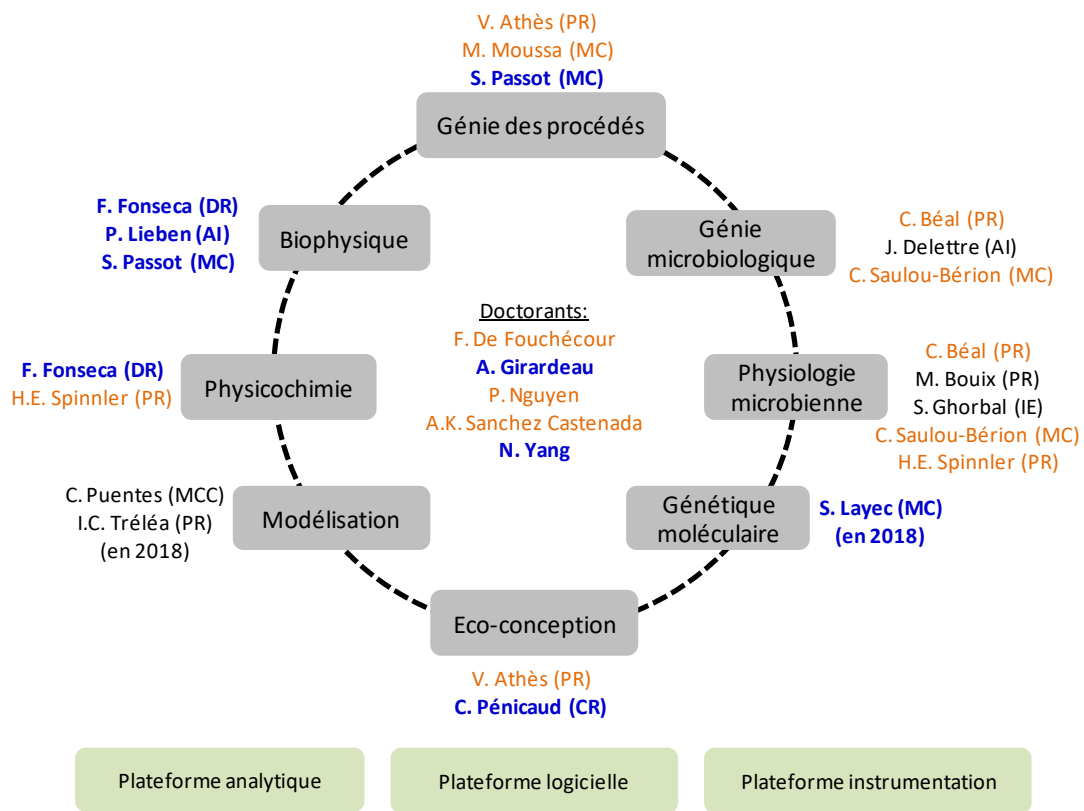


Figure 3 : Organisation des compétences au sein de l'équipe BioMiP et répartition par objet d'étude (Bleu : ferments concentrés stabilisés / orange : biomolécules / noir : intervention sur les 2 objets d'étude)

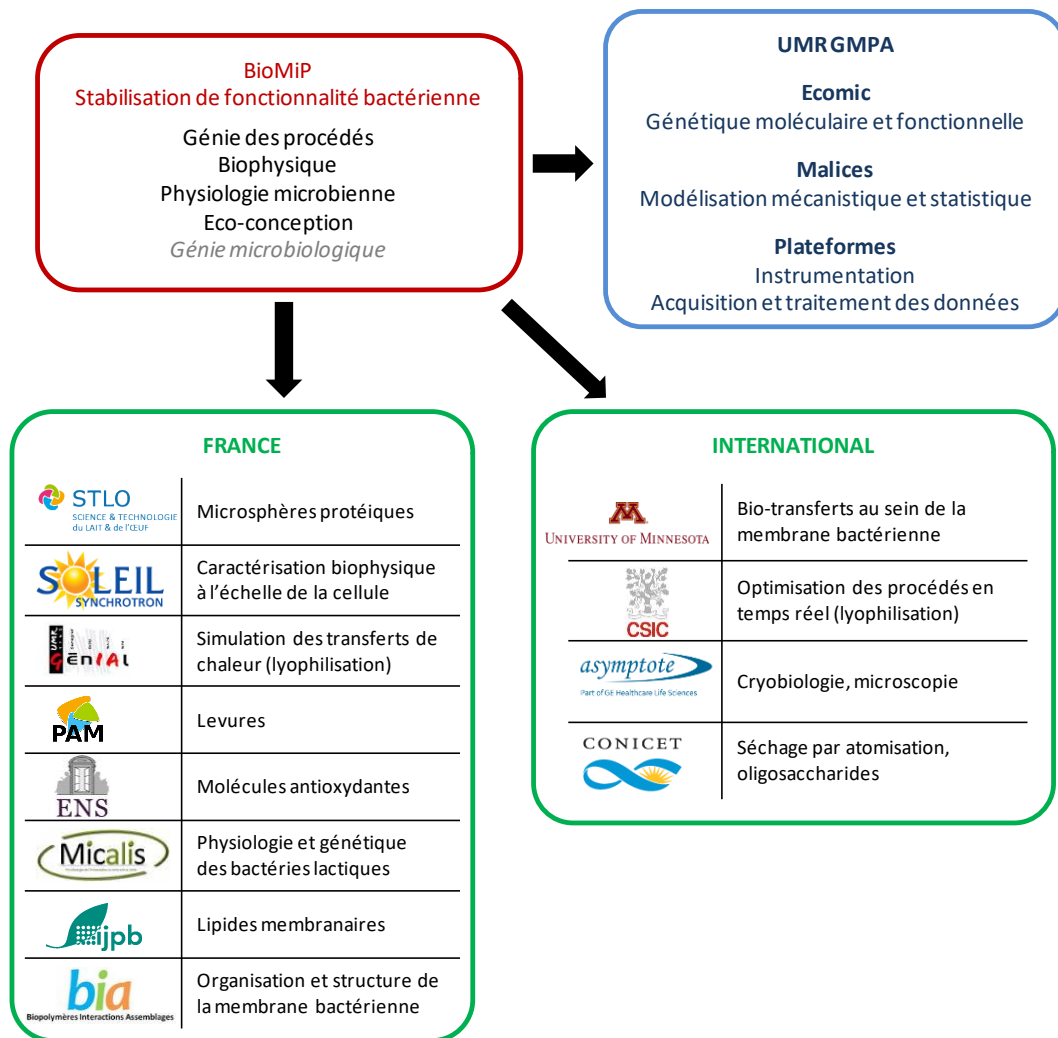


Figure 5 : Partenariat scientifique établi pour la réalisation de nos travaux de recherche sur la stabilisation de fonctionnalités biologiques

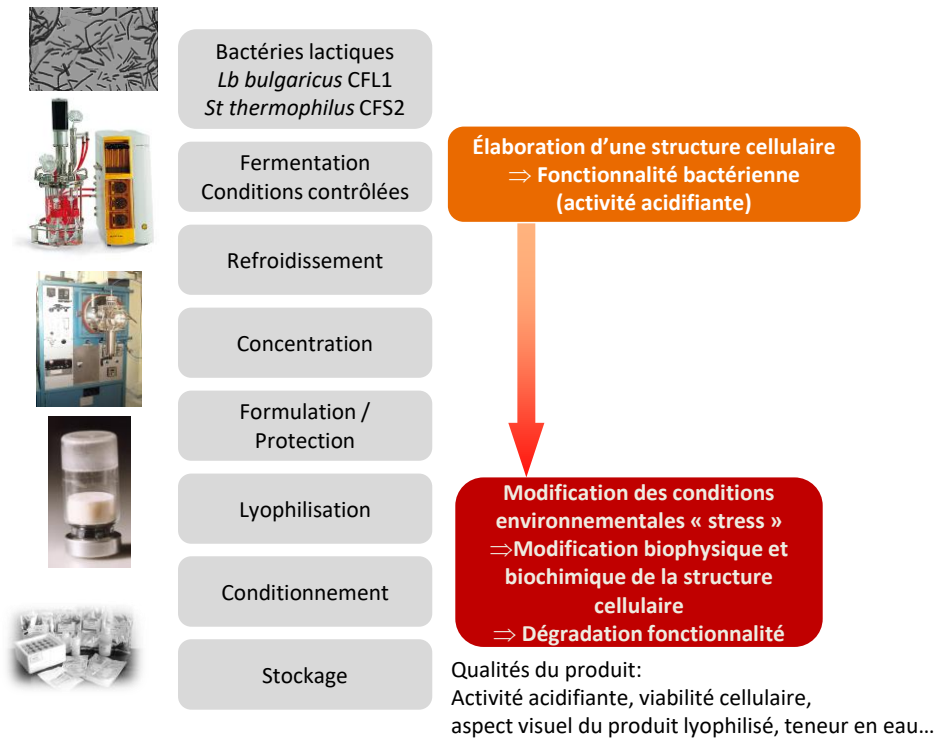


Figure 6: Schéma simplifié de production des ferments lactiques concentrés lyophilisés

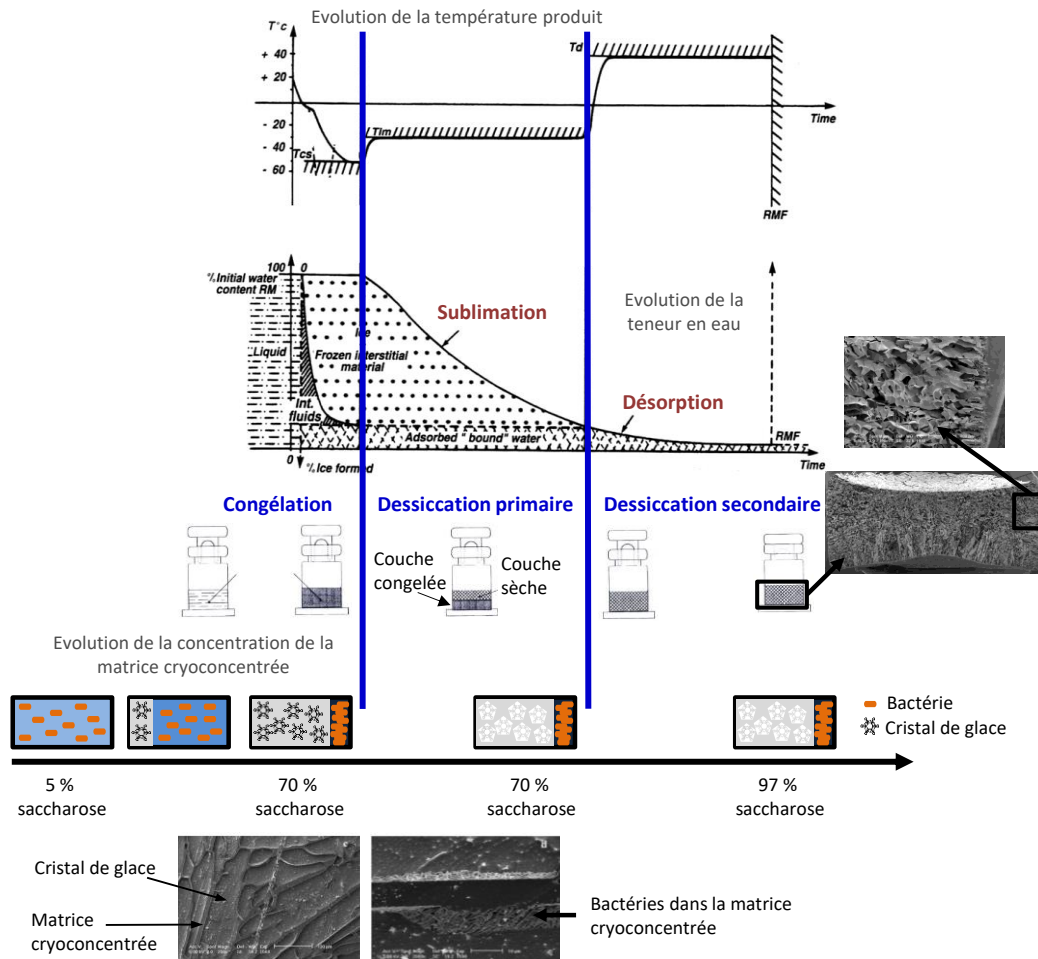


Figure 7 : Evolution de la température et de la teneur en eau du produit au cours du procédé de lyophilisation

Représentation schématique de l'évolution d'une suspension bactérienne incluant 5 % de saccharose

T_{cs} : température maximale de complète solidification (température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée T_g')

T_{im} : température d'effondrement (température limite assurant une sublimation rapide)

T_d : température maximale permise par le produit (température de transition vitreuse du produit sec ou température de dénaturation des protéines)

RMF : teneur en eau résiduelle

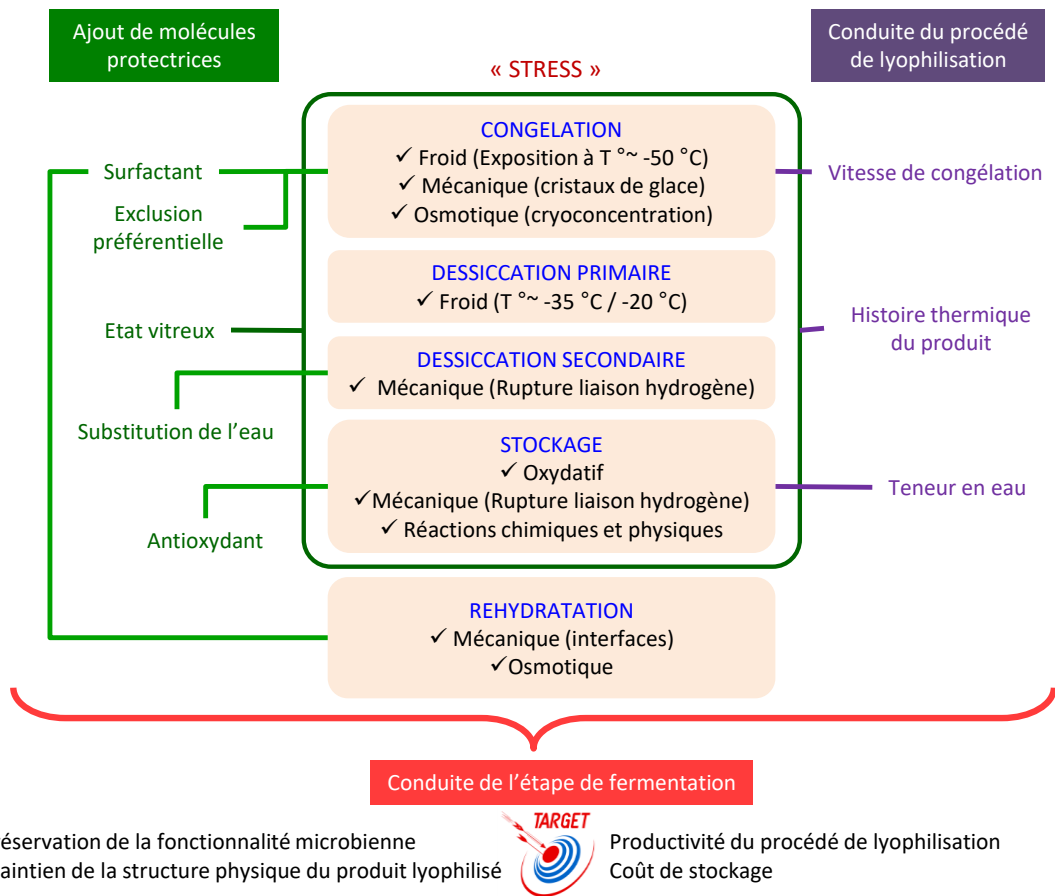
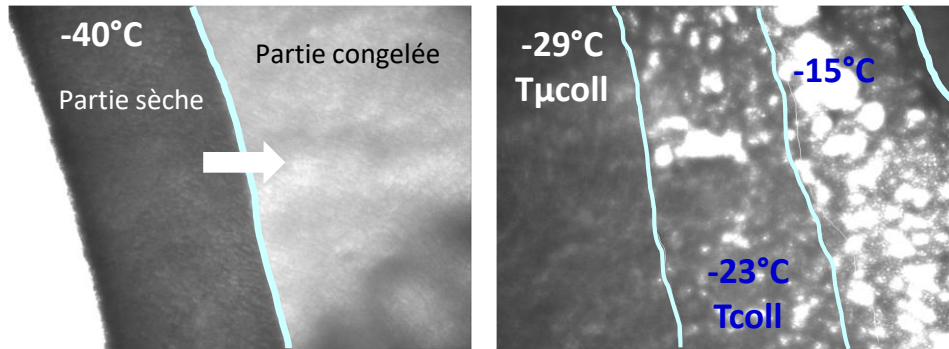


Figure 8 : Stratégies pour limiter les différents stress induits par le procédé de lyophilisation



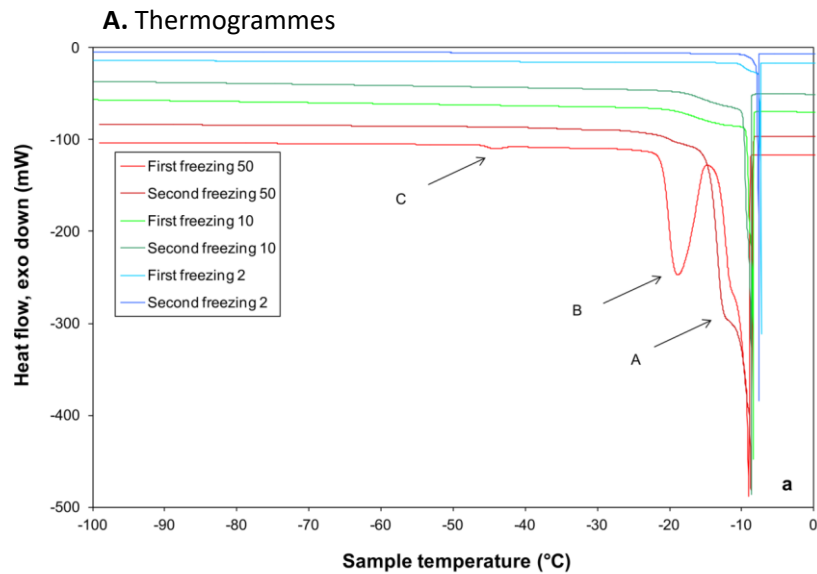
Tg' (°C)	T μ coll (°C)	Tcoll (°C)	ΔT (°C) = Tcoll - Tg'
-37	-29	-23	14

Figure 10: Photographies issues de l'observation microscopique du phénomène d'effondrement d'une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1, dans le milieu de fermentation (ratio massique 1 :1), lors de la sublimation de l'échantillon réalisée dans la cellule de cryodessiccation

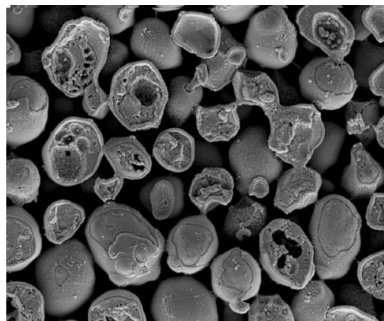
Tg' : température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée

Tcoll : température de collapse ou d'effondrement

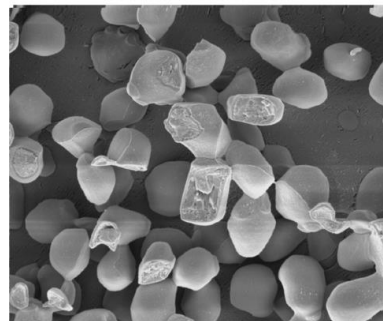
T μ coll : température de micro-effondrement



B. Images CryoSEM



Vitesse de congélation 50 °C/min

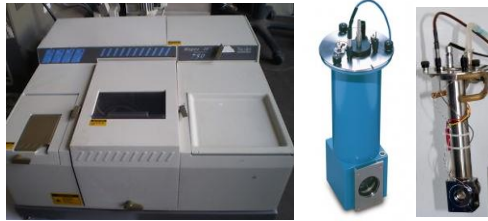


Vitesse de congélation 2 °C/min

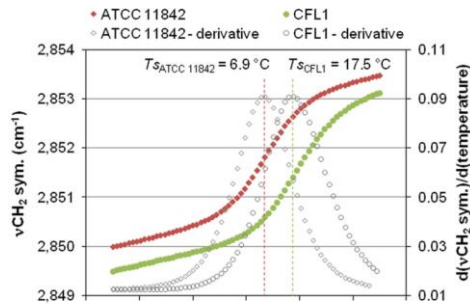
Figure 11: Détection de la formation de glace intracellulaire dans une suspension de levures (*S. cerevisiae* 338), par analyse enthalpique différentielle (A) et par cryomicroscopie électronique à balayage CryoSEM (B), lors d'une congélation à 50 °C/min et 2 °C/min

(A) Thermogrammes obtenus lors du refroidissement de l'échantillon à 50 °C/min (courbes rouges), 10 °C/min (courbes vertes) et 2 °C/min (courbes bleues). Les lettres majuscules A, B et C correspondent à des événements exothermiques de cristallisation de l'eau.

A. Spectromètre infrarouge et cellule de refroidissement



B. Transition de phase lipidique



C. Groupements phosphate

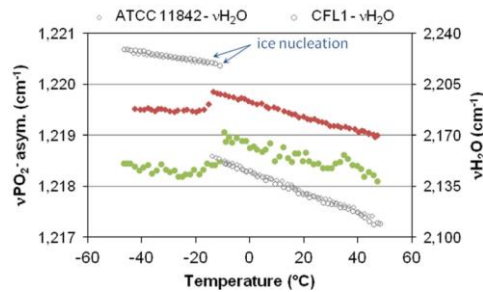


Figure 12 : Caractérisation du comportement biophysique des membranes bactériennes lors du refroidissement par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier – Application à deux souches de *L. bulgaricus* : une souche sensible à la congélation (CFL1, représentée en vert) et une souche résistante (ATCC 11842, représentée en rouge)

- (A) Dispositif expérimental
- (B) Evolution de la position de la bande de vibration caractéristique de l'élongation symétrique des groupes CH₂ ($\nu\text{CH}_2 \text{ sym.}$) avec la température. La dérivée première des courbes a également été représentée sur la figure (représentée en gris). T_s : température de transition lipidique mesurée lors de la phase de refroidissement.
- (C) Evolution de la position de la bande de vibration caractéristique de l'élongation asymétrique des groupes PO_2^- ($\nu\text{PO}_2^- \text{ asym.}$) avec la température. L'évolution de la bande de libration et de flexion de l'eau ($\nu\text{H}_2\text{O}$, en gris), avec la température, est également représentée sur la figure pour déterminer la température de formation des cristaux de glace.

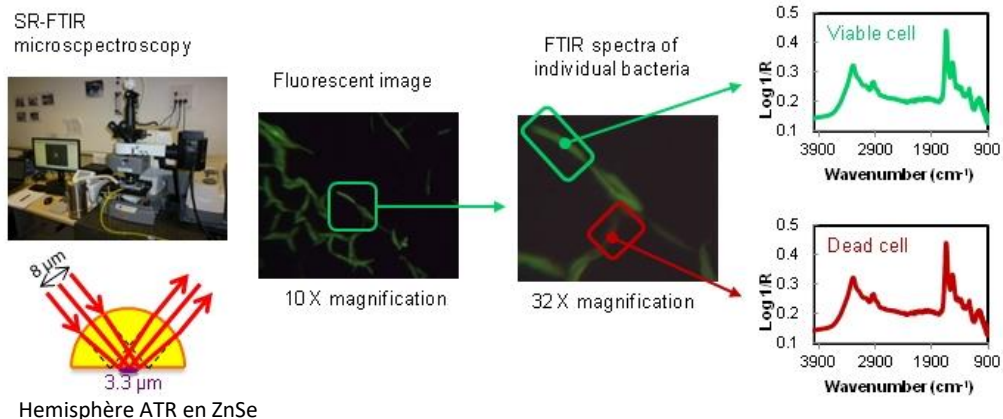


Figure 13 : Dispositif expérimental de microspectroscopie infrarouge, combiné au rayonnement synchrotron, permettant de déterminer l'état physiologique des cellules bactériennes et l'acquisition du spectre infrarouge associé.

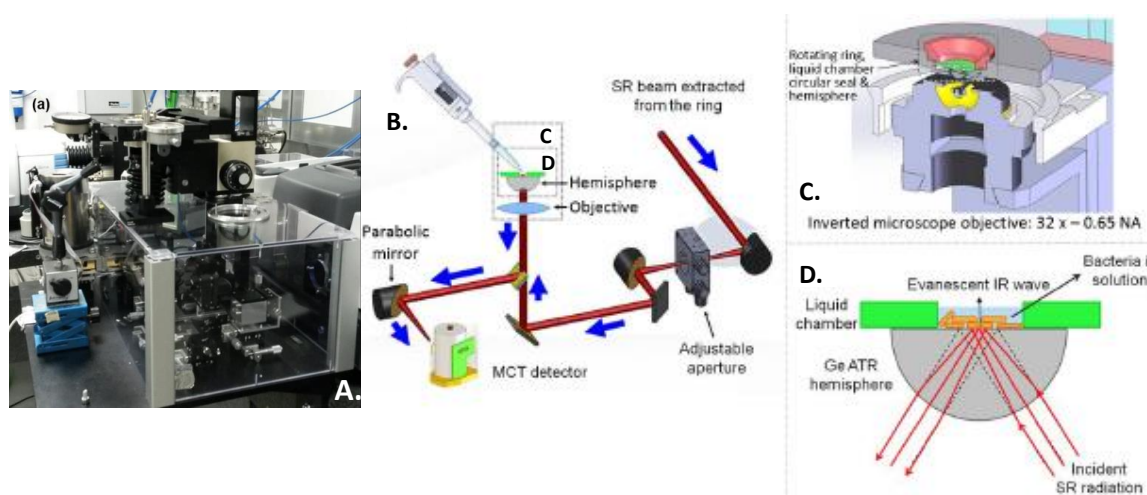


Figure 14 : Dispositif expérimental permettant l'acquisition de spectres infrarouges de bactéries individuelles en milieu aqueux (configuration de microscope infrarouge ATR inversé, SR : synchrotron)

- (A) Photographie de l'équipement
- (B) Vue schématique du trajet optique du rayonnement infrarouge
- (C) Vue d'une coupe transversale de l'objectif du microscope inversé et de la chambre échantillon
- (D) Agrandissement de la zone de dépôt de l'échantillon liquide

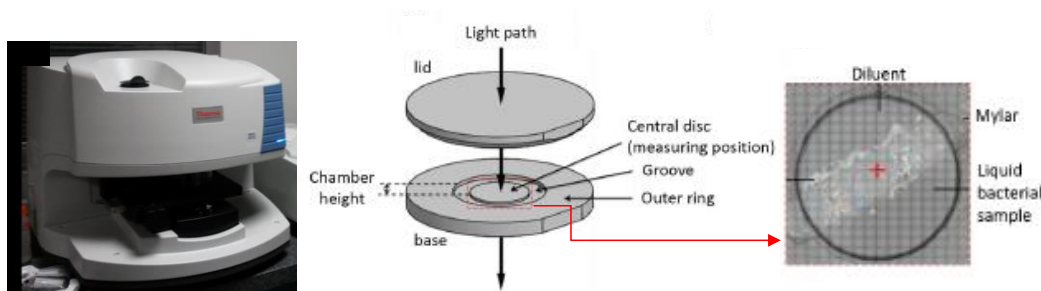


Figure 15 : Dispositif expérimental permettant l'acquisition des spectres infrarouges de bactéries en milieu aqueux à l'échelle de la population bactérienne

(Nicolet IN10 microscope infrarouge de laboratoire et micro-chambre en CaF₂ Hellma)

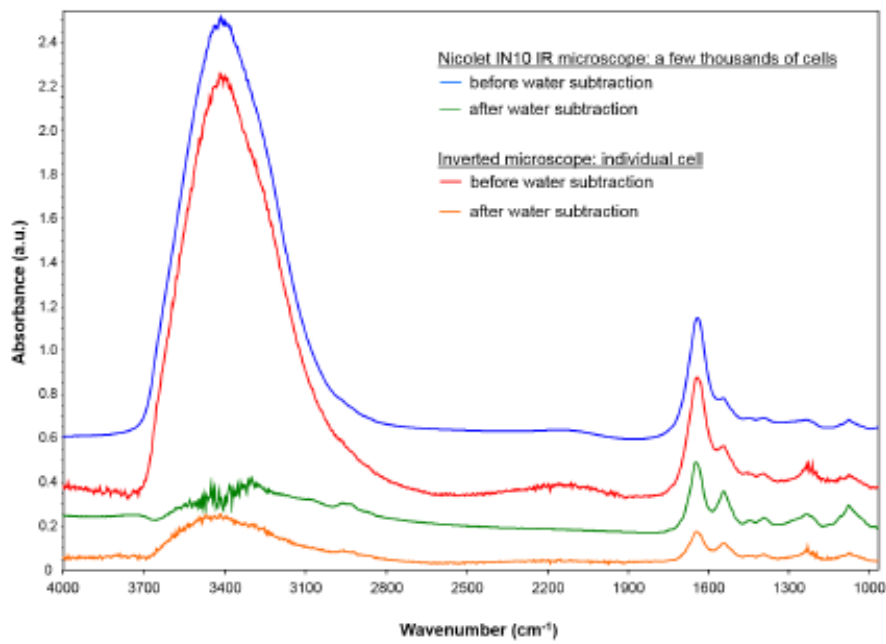


Figure 16 : Exemples de spectres infrarouges obtenus avec le microscope infrarouge Nicolet IN10 (représenté en bleu et vert, quelques milliers de cellules) et avec le microscope infrarouge inversé, utilisant le rayonnement synchrotron (représenté en rouge et orange, une seule cellule), sur une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* ATCC 11842 dans une solution saline. La contribution de l'eau a été éliminée en appliquant le programme Matlab développé en interne.

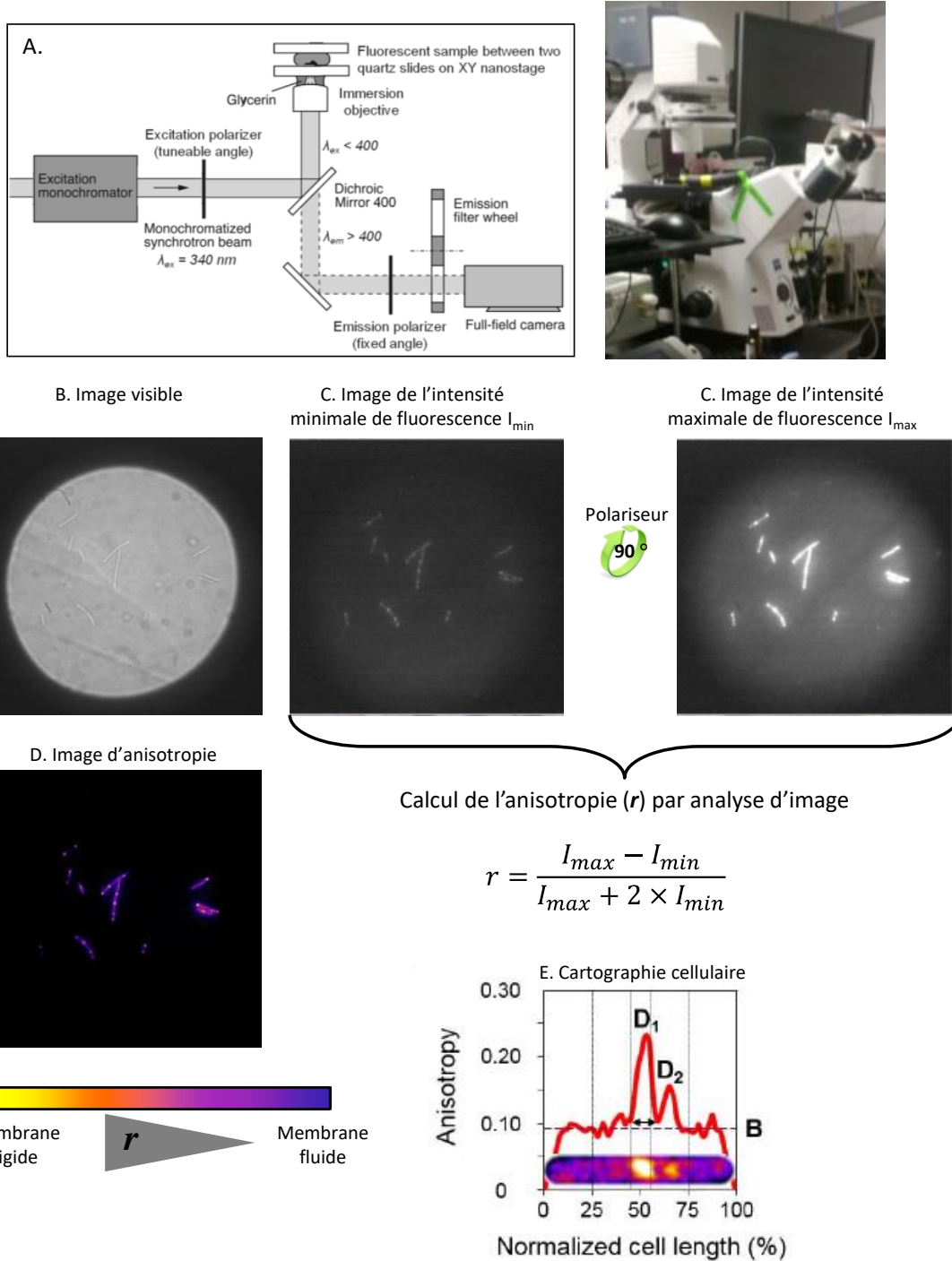


Figure 17 : Dispositif expérimental de mesure de la fluidité membranaire, par anisotropie de fluorescence sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL – Exemples d’images obtenues et de traitement des images

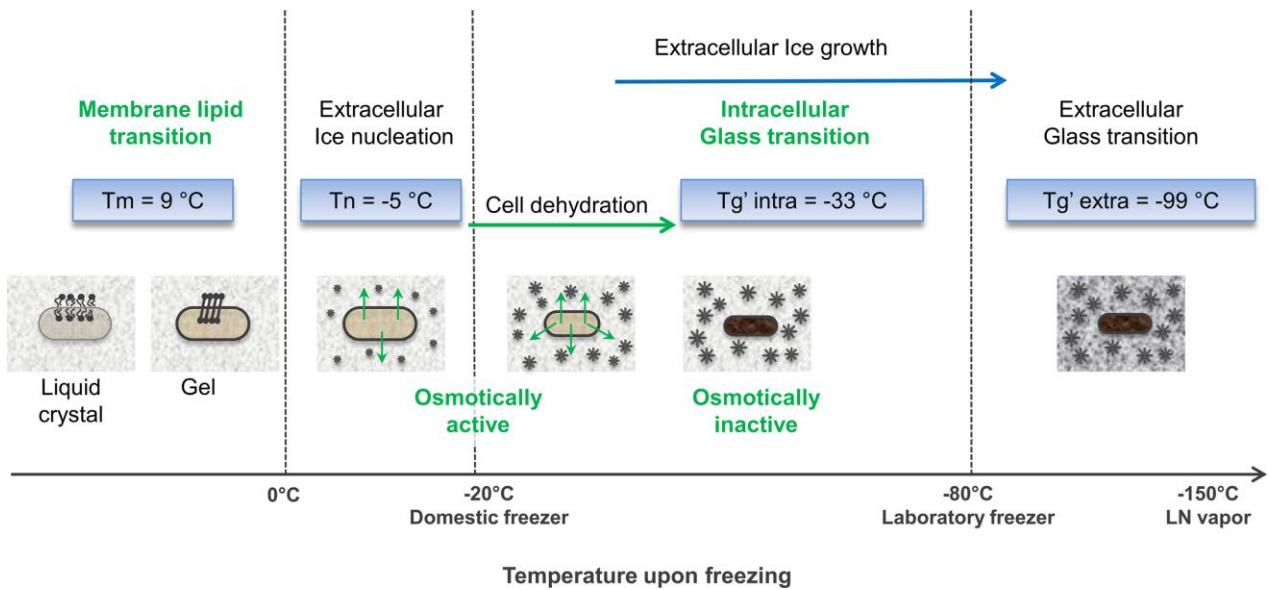


Figure 18 : Représentation schématique des différents événements physiques, ayant lieu lors de la congélation d'une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1, cultivée en milieu lactosérum et protégée avec du glycérol (0.58 M)

T_m (ou T_s) : température de transition lipidique de la membrane plasmique

T_n : température de nucléation ou de cristallisation

T_g' : température de transition vitreuse du milieu intracellulaire (intra) ou du milieu extracellulaire (extra)

LN : liquid nitrogen

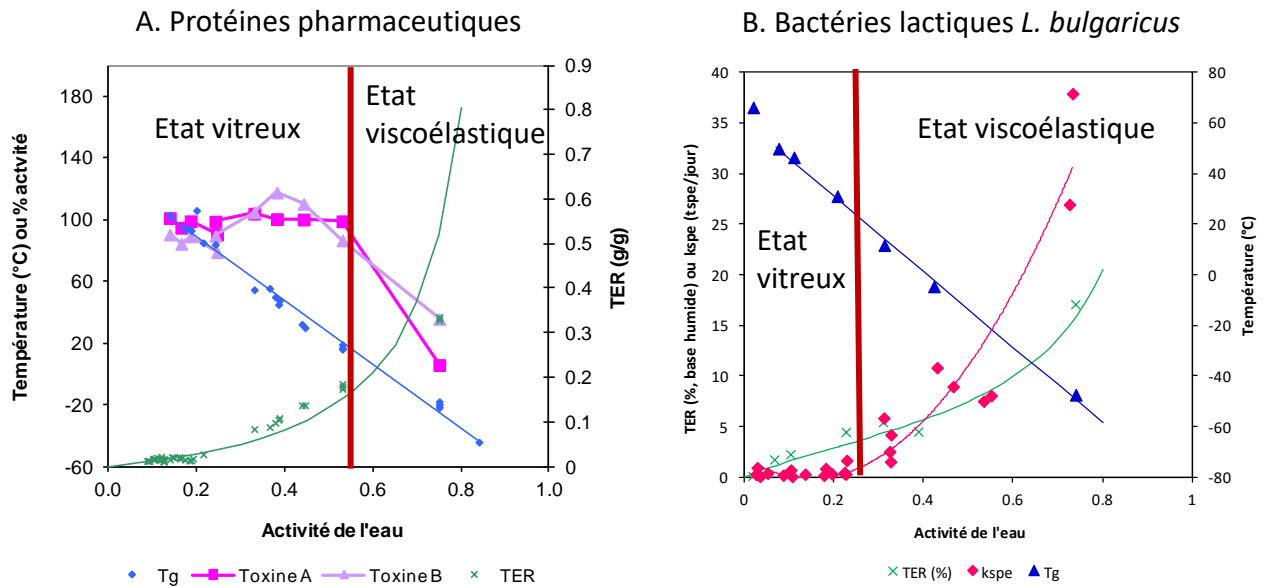


Figure 19 : Relation entre l'activité de l'eau, la température de transition vitreuse (Tg), la teneur en eau résiduelle (TER) et l'activité antigénique résiduelle (% activité) des toxines A et B de *Clostridium difficile*, après 6 mois de stockage à 25 °C (A), ou les pertes d'activité acidifiante (kspe en (min/(log(UFC/mL)))/jour) lors d'un stockage à 25 °C d'une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1 lyophilisée en présence de saccharose (B)

Les toxines A et B de *Clostridium difficile* ont été lyophilisées dans une matrice composée de PVP (4%) et de saccharose (1%). La ligne verticale rouge indique la valeur d'activité de l'eau correspondant à l'égalité de la température de stockage (25 °C) et la température de transition vitreuse.

UFC : unité formant colonie

PVP : polyvinylpyrrolidone

Tableau 5 : Effet des conditions opératoires de l'étape de sublimation, sur les pertes d'activité acidifiante d'une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1, observées après le procédé de lyophilisation (dtm) et au cours du stockage à 25 °C (k)

	Etape de sublimation (T°étagère / Pression)	
	(-20 °C / 20 Pa) Tg' = -26 °C	(0 °C / 20 Pa) Tcoll = -27 °C
T°produit	-32 °C	-27 °C
T°produit – Tg'	4 °C	9 °C
dtm (min)	214	126
k (min/jour)	2,8	2,1

La suspension bactérienne a été lyophilisée en présence de saccharose.

Tg' : température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée ; Tcoll : température d'effondrement

Une augmentation de dtm signifie une augmentation des pertes d'activité acidifiante.

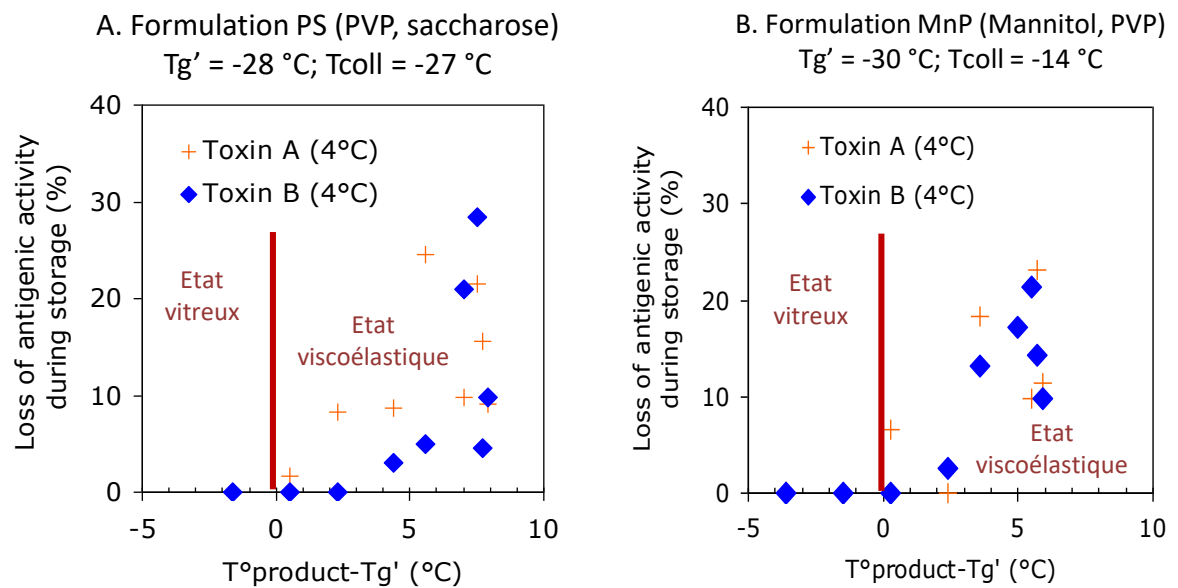


Figure 20 : Effet de l'écart de température entre la température du produit atteinte au cours de l'étape de sublimation, (T°product) et la température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée (Tg') sur la perte d'activité antigénique des toxines A et B de *Clostridium difficile*, observée après 6 mois de stockage à 4 °C.

La ligne verticale rouge indique la séparation entre l'état vitreux et l'état viscoélastique de la matrice. (T°product-Tg' = 0 °C).

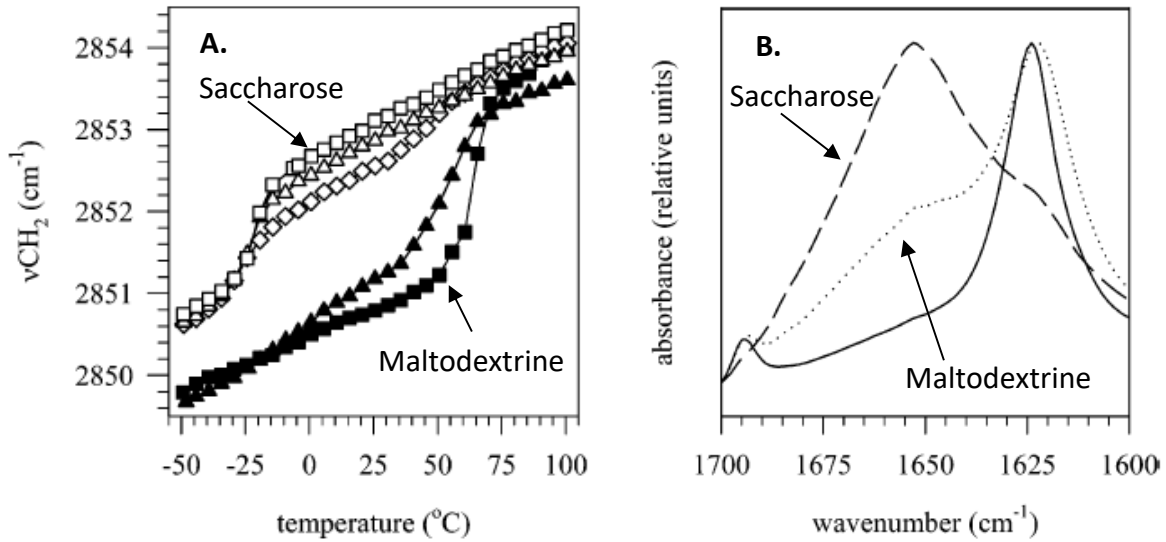


Figure 21 : Comportement de la membrane multi-lamellaire de liposomes de POPC (A, évolution de la vibration de la bande d'élongation symétrique des groupes CH_2 avec la température) et structure secondaire d'une solution protéique de poly-L-lysine (B, spectre infrarouge bande d'absorption amide I), séchés à l'air sec et caractérisés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les liposomes ont été séchés en présence de saccharose (carrés vides), maltodextrine (carrés pleins), de différents mélanges de saccharose et de maltodextrine (1/4 triangles pleins ; 2,5/2,5 losanges vides ; 4/1 triangles vides). La solution de poly-L-lysine a été séchée en présence de saccharose (tirets), de maltodextrine (pointillés) et en absence de protecteurs (trait plein).

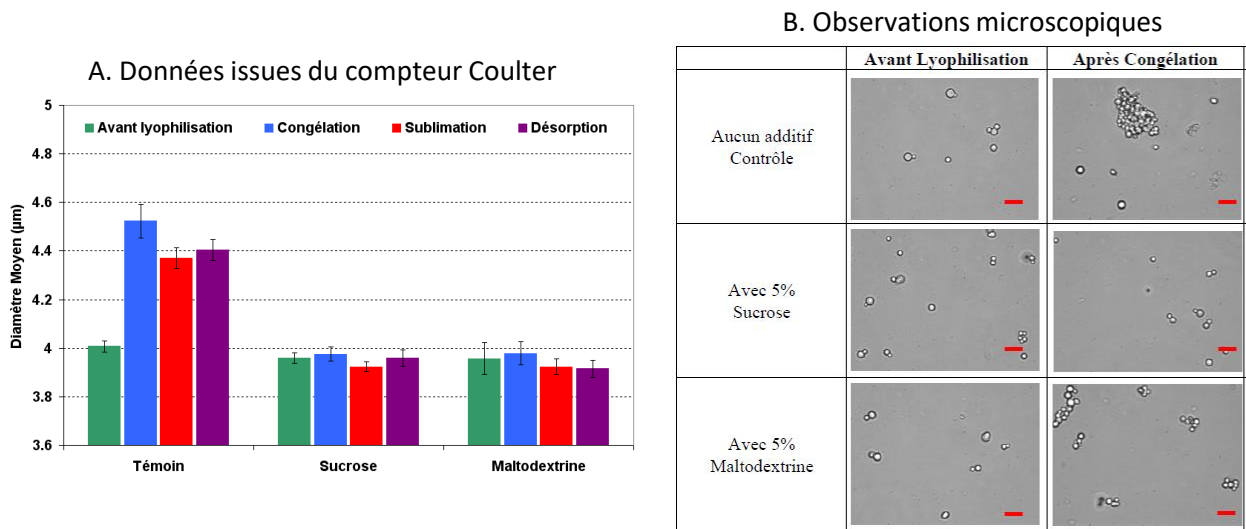


Figure 22 : Effet du saccharose et de la matlodextrine sur la stabilité de microsphères protéiques, formées par l'assemblage contrôlé de α -lactalbumine et de lysozyme, au cours du procédé de lyophilisation.

- A) Evolution du diamètre moyen des microsphères déterminé à l'aide du compteur Coulter®, après chaque étape du procédé de lyophilisation.
 B) Observations microscopiques des microsphères, avant et après congélation (Barre d'échelle = 10 μm)

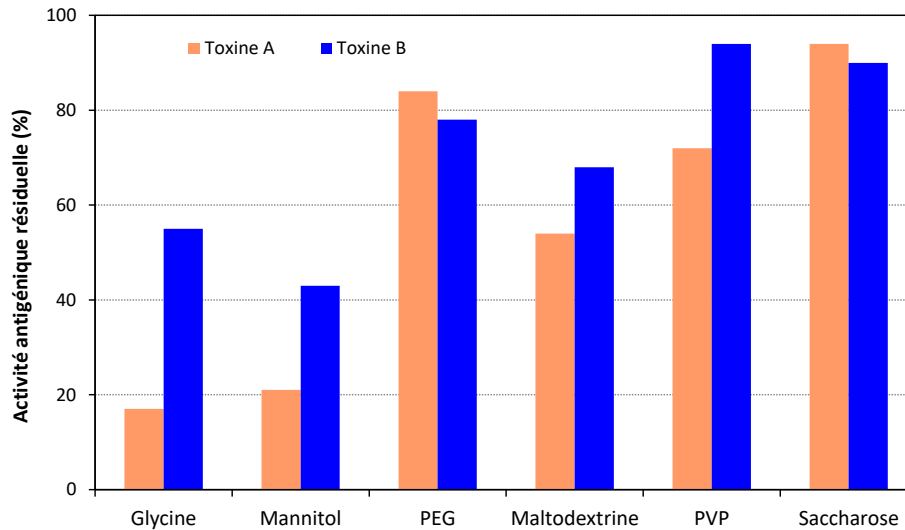


Figure 23 : Effet de différentes molécules protectrices sur l'activité antigénique des toxines A et B de *Clostridium difficile*, après 6 mois de stockage à 25 °C à l'état déshydraté

Les formulations protectrices sont composées de 4 % de la molécule mentionnée en abscisse et de 10 mM de Tris-HCl. Les concentrations respectives en toxines A et B, dans la solution initiale avant lyophilisation, sont 5,14 µg/mL et 3,88 µg/mL.

PEG : polyéthylène glycol / PVP : polyvinylpyrrolidone

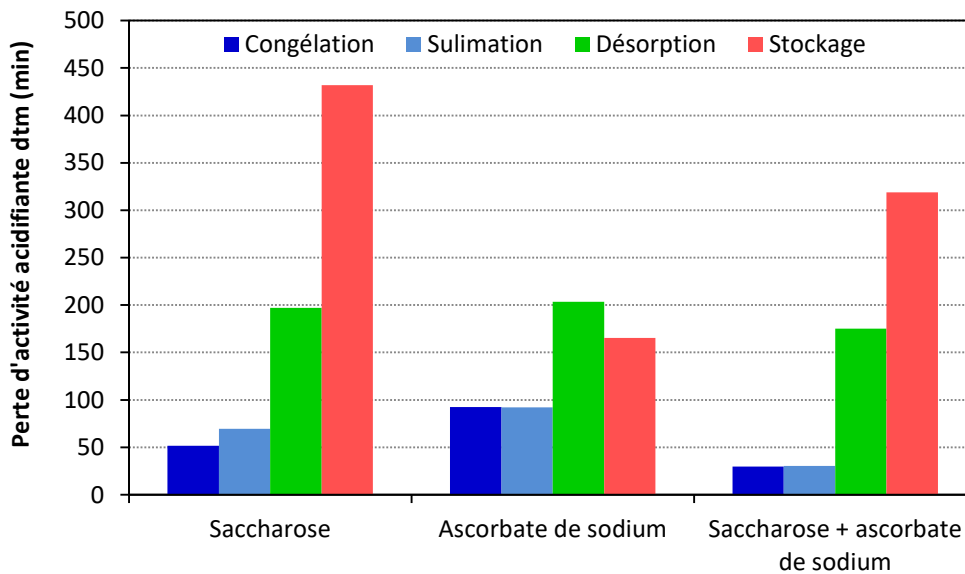


Figure 24 : Effet d'une molécule antioxydante (ascorbate de sodium) sur la perte d'activité acidifiante (dtm) de *L. bulgaricus* CFL1, déterminée pour les différentes étapes du procédé de lyophilisation

Le stockage a été réalisé à 25 °C pendant 3 mois.

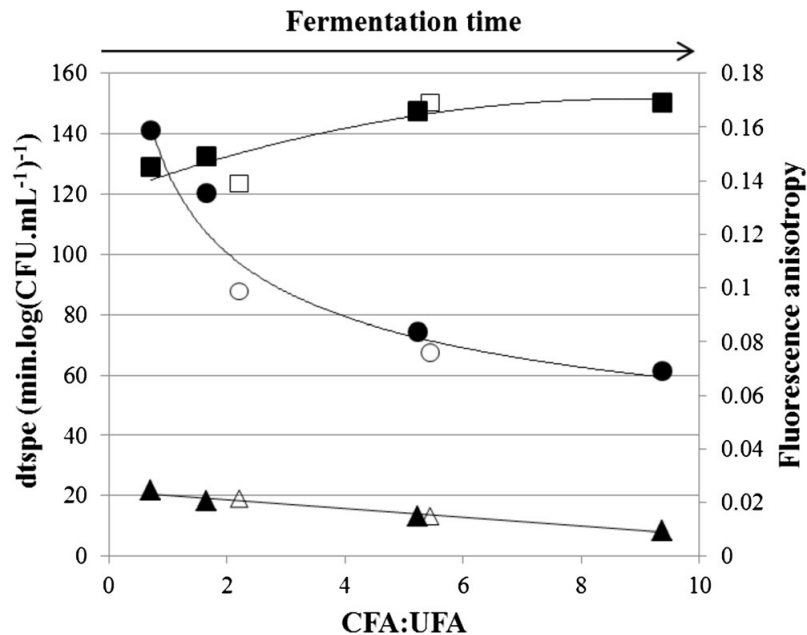


Figure 25 : Corrélation entre le ratio CFA:UFA (acides gras cycliques : acides gras insaturés), l'anisotropie de fluorescence (carrés) et les pertes d'activité acidifiante (dtspe), après lyophilisation (triangles) et après 3 mois de stockage (cercles), d'une population de *L. lactis* TOMSC161 obtenues après culture à différentes températures (22 °C, symboles vides et 30 °C, symboles pleins)

CFA : cyclic fatty acids, acides gras cycliques / UFA : unsaturated fatty acids, acides gras insaturés

Tableau 7 : Récapitulatif des propriétés de la membrane et de la résistance aux procédés de stabilisation des populations bactériennes, générées lors des travaux de thèse de de H. Velly, J. Gautier et J. Meneghel : composition en acides gras, température de transition lipidique (T_m), anisotropie de fluorescence (r)

	<i>L. lactis</i> (Thèse H. Velly)		<i>L. bulgaricus</i> (Thèse J. Gautier)		<i>L. bulgaricus</i> (Thèse J. Meneghel)	
	T4	T1	MRS	Lactosérum	CFL1	ATCC
C16:0	56.4	50.5	18	38	37	27
C18:1	3.3	25.4	48	22	15	25
CyclC19:0	35.2	18.6	14	2	3	4
Autres SFA	6.1	4.4	15	27	19	18
Autres UFA	0.4	1.1	5	11	24	23
CFA:UFA	9.51	0.70	0.26	0.06	0.08	0.08
T_m (°C)	17	18	-5	37	18	7
r (25 °C)	0.169	0.145	0.139	0.212	0.188	0.169
RESISTANCE AU PROCEDE						
Congélation	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI
Lyophilisation	OUI	NON	nd	nd	nd	nd

nd : non déterminé

T4 et T1 correspondent à deux temps de récolte : T1 phase exponentielle de croissance ; T4 phase stationnaire avancée.

Se reporter au Tableau 6 pour plus d'informations sur les conditions de culture.

CFA : cyclic fatty acids, acides gras cycliques / UFA : unsaturated fatty acids, acides gras insaturés / SFA : saturated fatty acids, acides gras saturés.

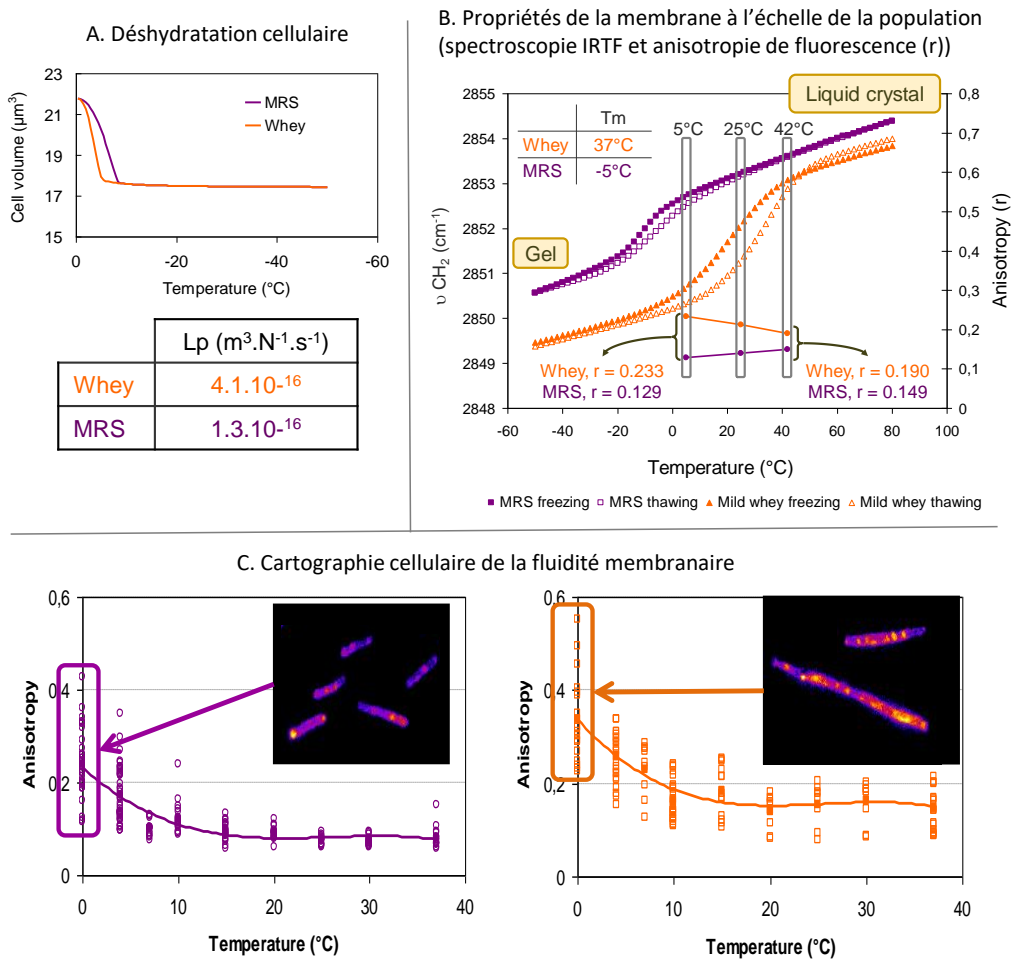


Figure 26 : Caractérisation des propriétés biophysiques de la membrane des deux populations bactériennes de *L. bulgaricus* CFL1, générées lors de la thèse de J. Gautier

Population bactérienne représentée en violet : culture en milieu MRS et résistance à la congélation.

Population bactérienne représentée en orange : culture en milieu lactosérum (whey) et sensibilité à la congélation.

T_m : température de transition lipidique ; L_p : coefficient de perméabilité à l'eau de la membrane

L'anisotropie de fluorescence (r) est inversement proportionnelle à la fluidité membranaire. Une diminution de la valeur de r représente une augmentation de la fluidité membranaire.

Images de cartographie cellulaire de fluidité membranaire (zone bleue : faible valeur d'anisotropie ou « membrane fluide » / zone jaune : forte valeur d'anisotropie ou « membrane rigide »).

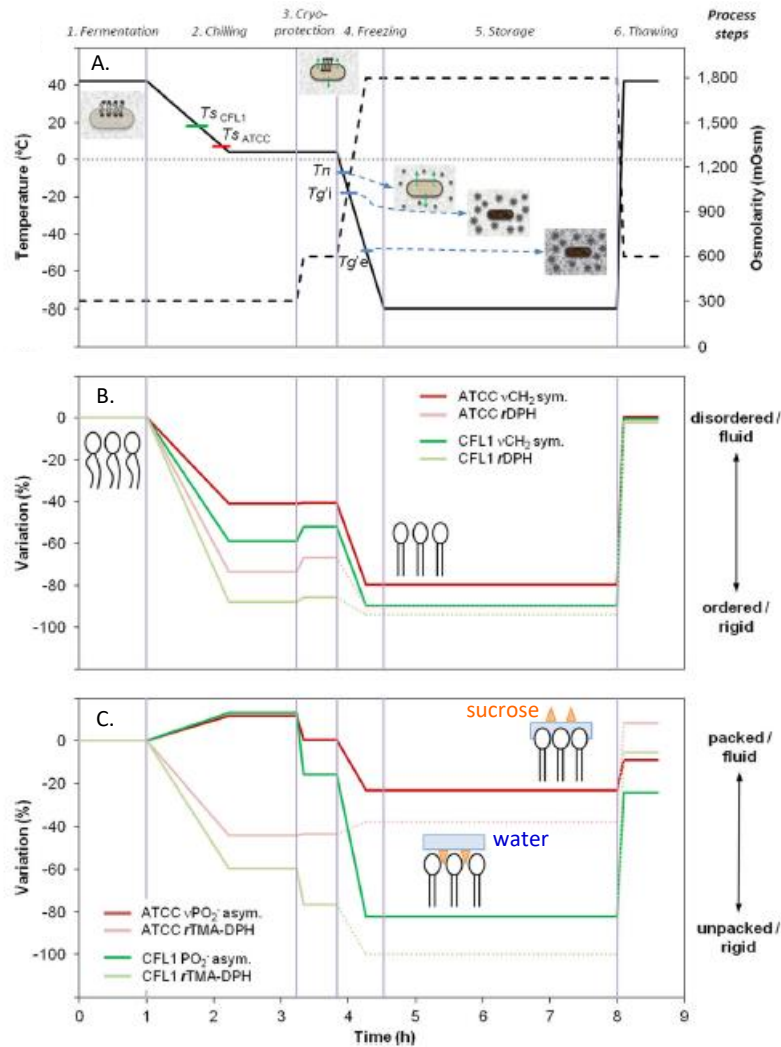


Figure 27 : Caractérisation de l'évolution, au cours du procédé de congélation, des propriétés biophysiques de la membrane des deux populations bactériennes de *L. bulgaricus* CFL1 (représentée en vert) et *L. bulgaricus* ATCC11842 (représentée en rouge), générées lors de la thèse de J. Meneghel

- A) Evolution de la température (trait plein) et de l'osmolarité (trait discontinu) de la suspension bactérienne lors du procédé de congélation et représentation schématique des principaux événements physiques.
- B) Evolution des propriétés de la partie hydrophobe centrale de la bicouche lipidique.
- C) Evolution des propriétés de la partie hydrophile externe (têtes polaires des phospholipides) de la bicouche lipidique.

T_s : température de transition lipidique ; T_n : température de nucléation ou cristallisation de l'eau ; Tg'_i : température de transition vitreuse intracellulaire ; Tg'_e : température de transition vitreuse du milieu extracellulaire.

r : anisotropie de fluorescence mesurée en utilisant les sondes fluorescentes DPH et TMA-DPH.

νCH_2 : position de la bande de vibration associée à l'élongation symétrique des groupes CH_2 .

νPO_2^- : position de la bande de vibration associée à l'élongation asymétrique des groupes PO_2^- .

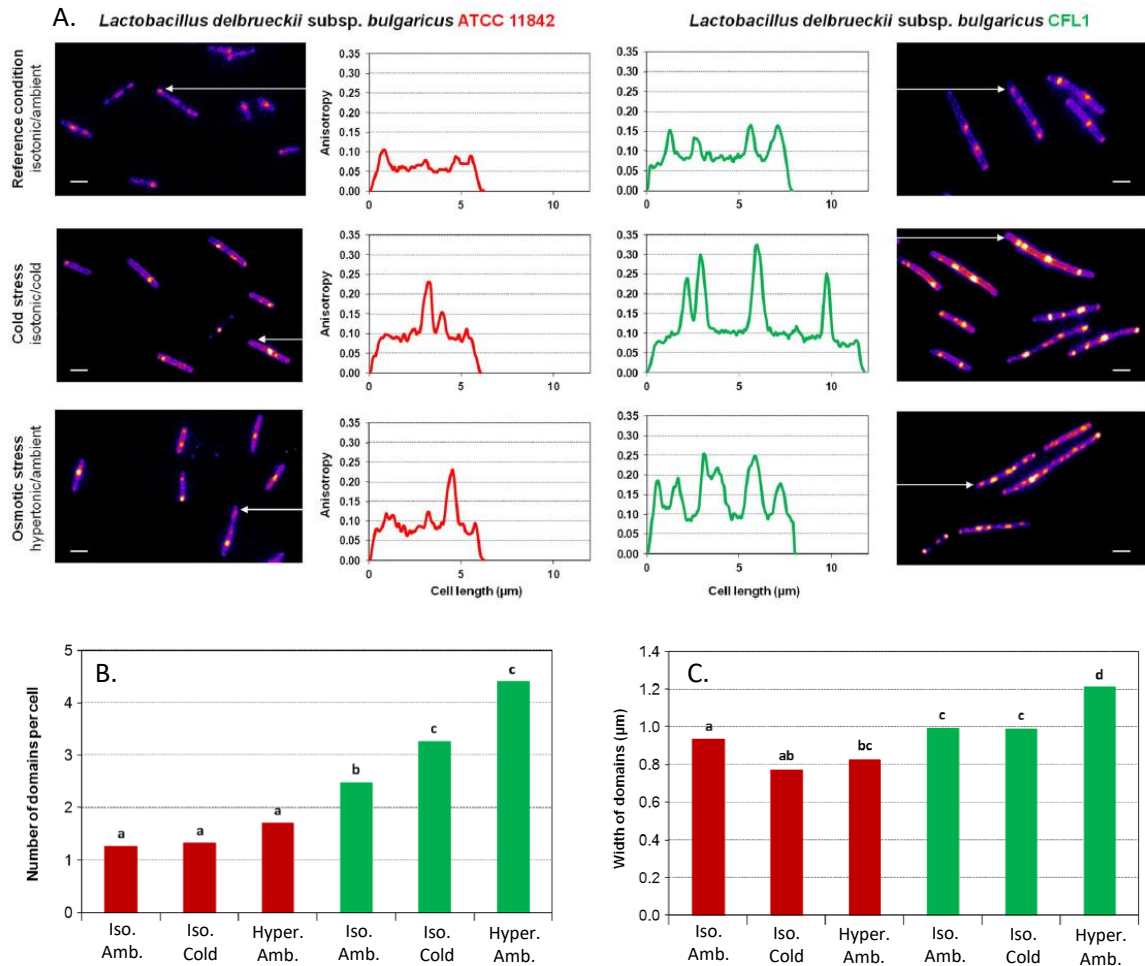


Figure 28 : Cartographie cellulaire de la fluidité membranaire des deux populations bactériennes de *L. bulgaricus* CFL1 (représentée en vert) et *L. bulgaricus* ATCC11842 (représentée en rouge), générées lors de la thèse de J. Meneghel et soumises à des stress froid et osmotique

- A). Images d’anisotropie de fluorescence et distribution de l’anisotropie le long d’une cellule représentative.
 B) Nombre de domaines rigides (représentés en jaune sur les images), au sein d’une cellule bactérienne pour les différentes conditions de stress.
 C) Largeur des domaines rigides pour les différentes conditions de stress.
 Iso : isotonic / Amb. : ambient / Hyper : hypertonic

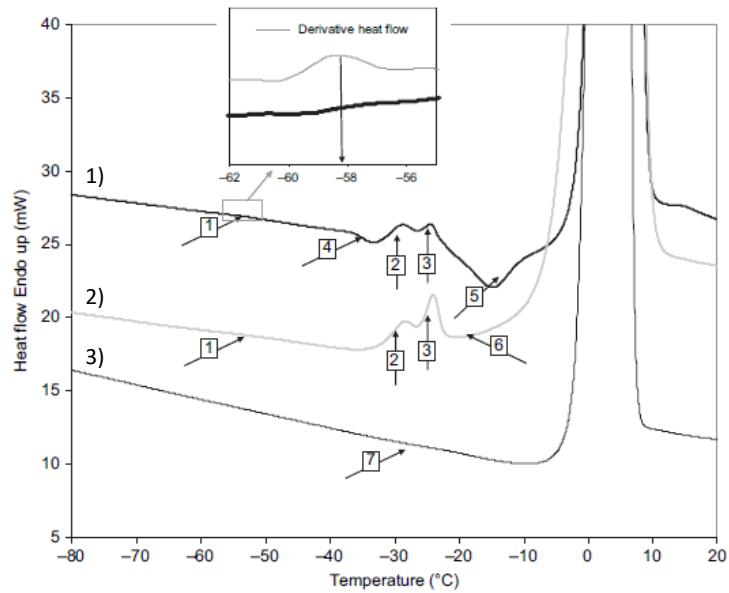


Figure 29 : Profils thermiques (thermogrammes), obtenus par analyse enthalpique différentielle lors du réchauffement d'une formulation composée de 4 % de mannitol, 1 % de PVP et 10 mM de Tris-HCl soumise à différents protocoles de refroidissement

- 1) Refroidissement de l'échantillon à 10 °C/min.
 - 2) Refroidissement de l'échantillon à 1 °C/min.
 - 3) Refroidissement de l'échantillon à 10 °C/min, suivi d'une étape de recuit à -20 °C pendant 60 min.
- Événements 1, 2, 3 et 7 : transition vitreuse
 Événements exothermiques 4, 5 et 6 : cristallisation du mannitol

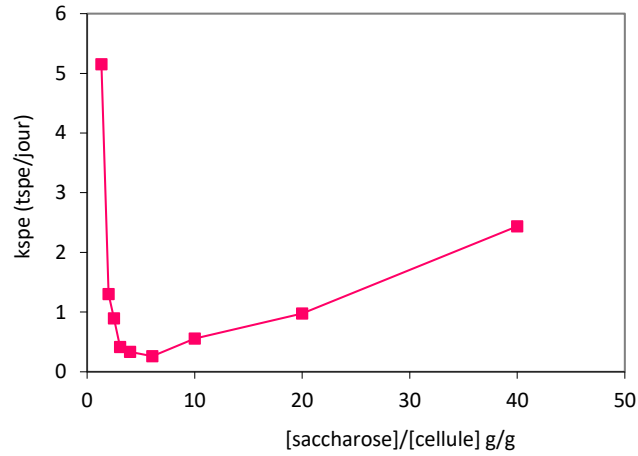


Figure 30 : Effet du ratio massique entre la concentration en saccharose et la concentration en cellule sur la perte d'activité acidifiante (k_{spe} en $(\text{min}/(\log(\text{UFC}/\text{mL})))/\text{jour}$), lors d'un stockage à 25 °C, d'une suspension bactérienne de *L. bulgaricus* CFL1 à l'état lyophilisé

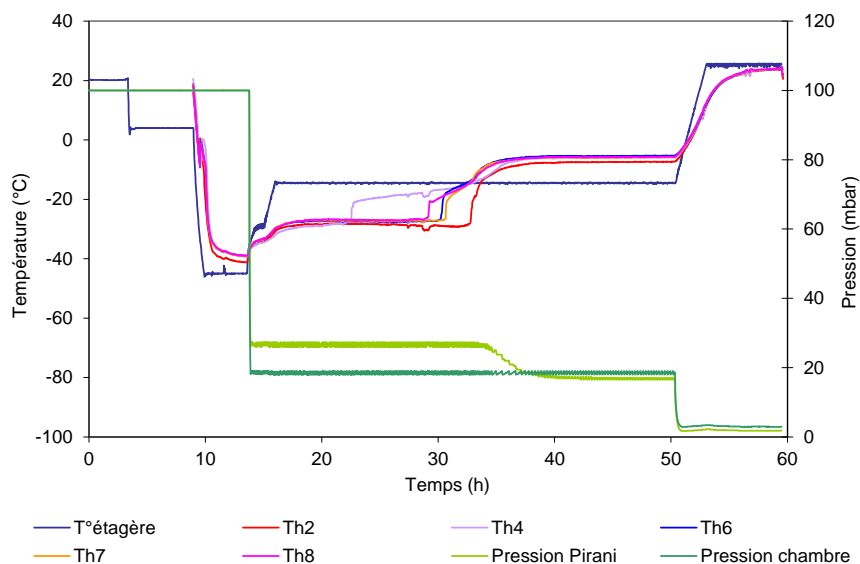


Figure 32 : Profils de température d'étagère, de température de produit (Th) et de pression, obtenus lors d'un cycle de lyophilisation

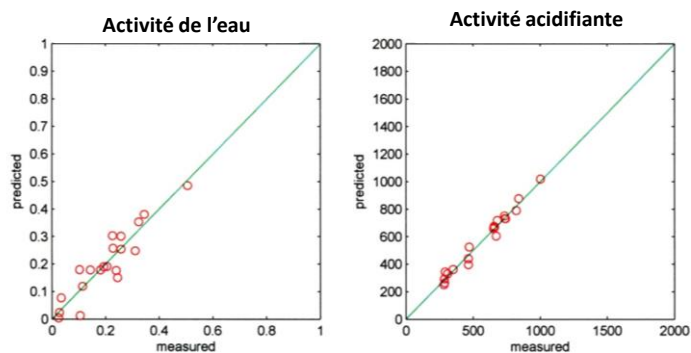


Figure 33 : Application de la technologie du nez électronique pour prédire la qualité des bactéries lactiques lyophilisées (activité de l'eau et activité acidifiante)

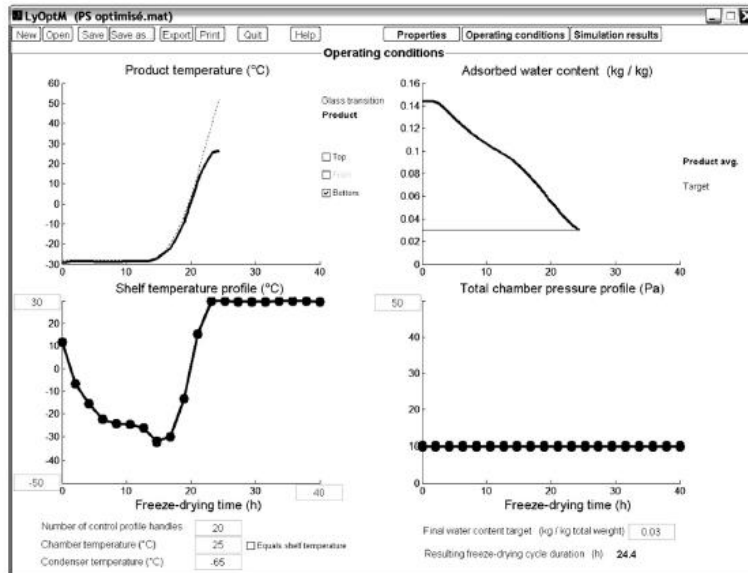


Figure 34 : Interface interactive du logiciel LyOptM de simulation des cinétiques de lyophilisation
Exemple d'un profil de température étagère optimisé, pour assurer une valeur de température produit, la plus proche possible de la température d'effondrement (température de transition vitreuse)

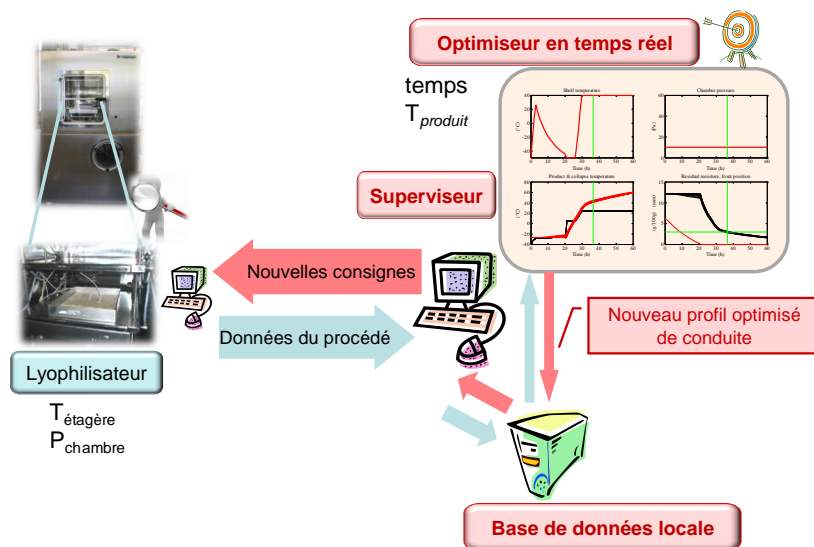


Figure 35 : Architecture du système de contrôle intelligent en temps réel du procédé de lyophilisation, développé dans le cadre du projet européen CAFE.

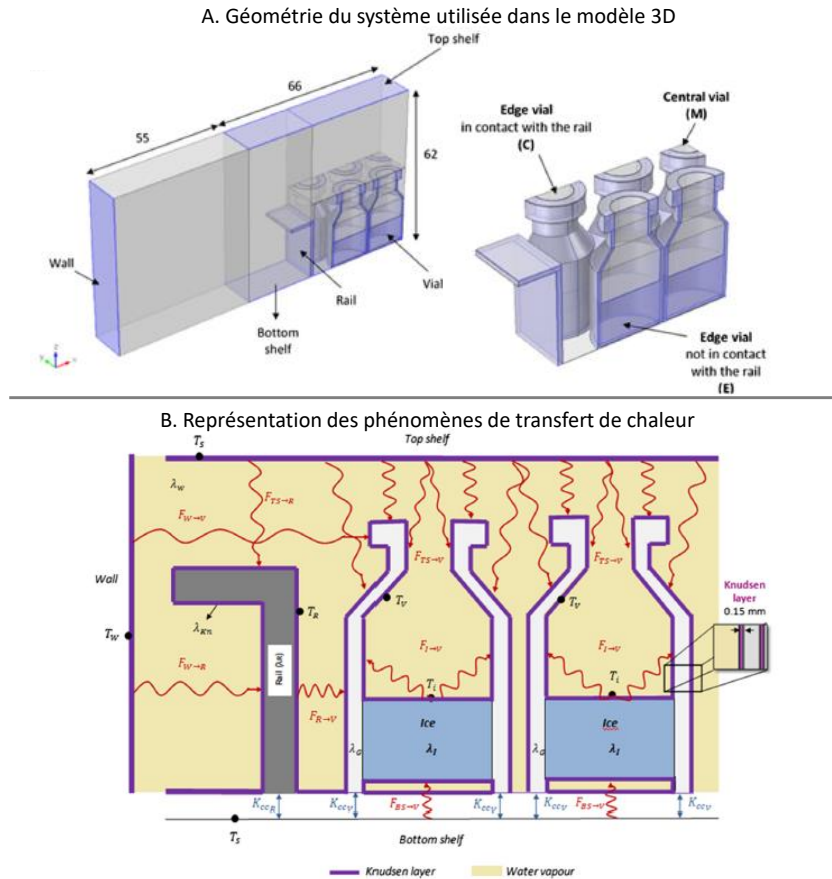


Figure 36 : Vues 3D de la géométrie utilisée pour représenter une portion de l'enceinte de lyophilisation (A) et représentation schématique des principaux phénomènes de transfert de chaleur lors de la sublimation (B)

T_S : température de l'étagère ; T_W : température de la paroi de l'enceinte de lyophilisation ; T_R : température du cadre métallique ; T_V : température du flacon ; T_i : température de l'interface de sublimation ; F : facteur de visualisation (rayonnement) ; λ : conductivité thermique ; K : coefficient de transfert de chaleur
 W : paroi ; s : étagère, BS : étagère de dessous ; TS : étagère du dessus ; V : flacon ; R : cadre métallique ; i : interface de sublimation ; I : glace ; G : verre ; cc : conduction par contact entre deux solides ; Kn : Knudsen

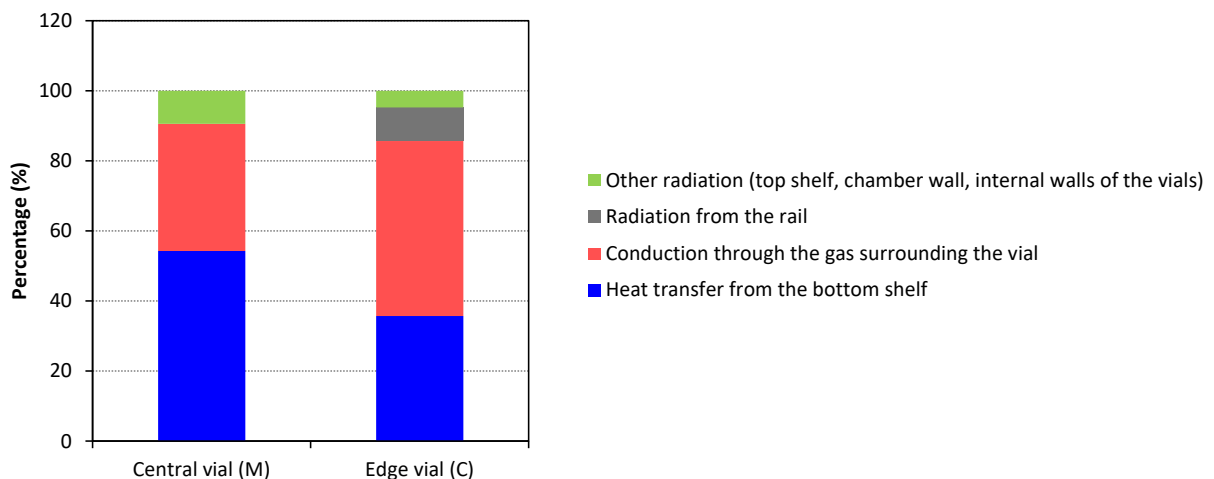
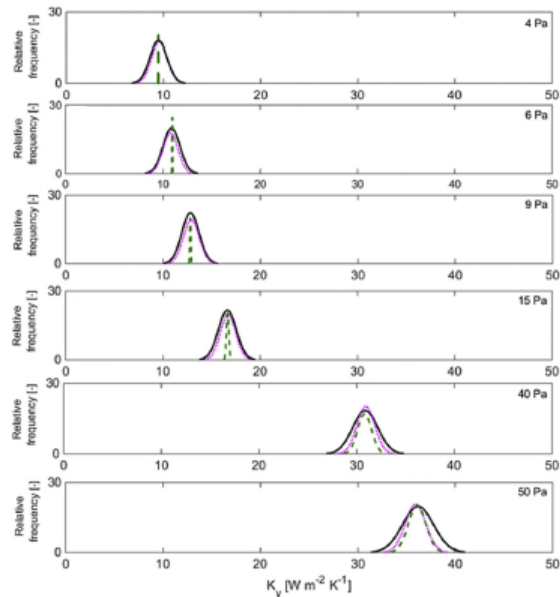


Figure 37 : Contribution relative des différents éléments du système (étagères, gaz entourant les flacons, cadre métallique, paroi de l'enceinte de lyophilisation, parois internes des flacons), au transfert de chaleur lors de la sublimation, pour des flacons situés au centre (notés M, central vial) et en périphérie de (notés C, edge vial, en contact direct avec le cadre métallique).

A. Variabilité du transfert de chaleur liée à la géométrie du flacon



B. Variabilité du transfert de matière

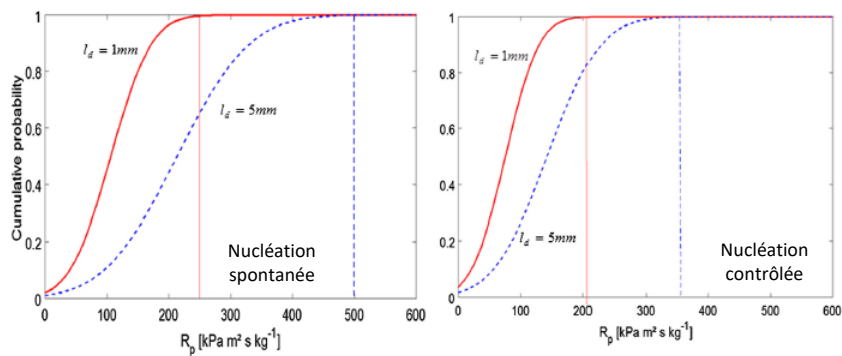
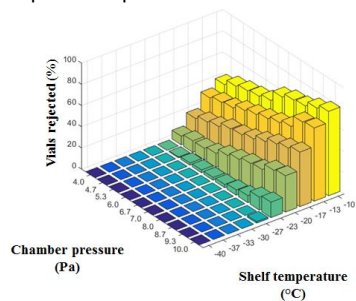


Figure 38 : A). Distribution calculée du coefficient de transfert de chaleur entre l'étagère et le flacon (K_v) (trait en tiret vert : distribution liée à la concavité du fond des flacons / trait en pointillés roses : distribution liée à l'aire de contact entre l'étagère et le flacon / trait plein noir : distribution liée aux deux paramètres précédents) et B) Distribution cumulée calculée de la résistance de la couche sèche au transfert de matière (R_p), dans les cas d'une nucléation de la glace spontanée (à gauche) et contrôlée (à droite) (trait plein rouge : distribution calculée pour une épaisseur de la couche sèche de 1 mm / trait en pointillés bleus : distribution calculée pour une épaisseur de la couche sèche de 5 mm)

A. Température produit non conforme



B. Durée de sublimation

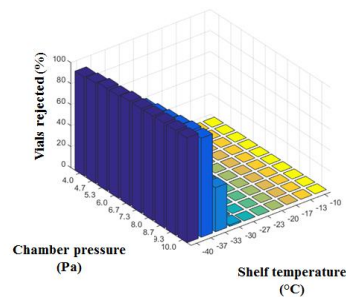


Figure 39 : Prédiction du pourcentage de flacons non conformes liés à la variabilité des paramètres de transfert de chaleur et de matière, lors de l'étape de sublimation, pour différentes conditions de température étagère et de pression.

A) Pourcentage de non-conformités dues à une température de produit excédant la température critique (température d'effondrement, T_{coll}).

B) Pourcentage de non-conformités dues à une durée de sublimation insuffisante.

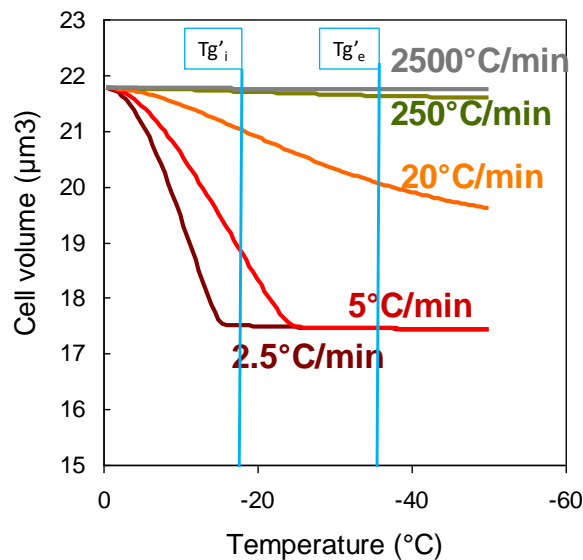


Figure 40 : Simulation de l'évolution du volume cellulaire de *L. bulgaricus* CFL1 avec la température, lors de l'étape de congélation, pour différentes vitesses de refroidissement. Les valeurs de température de transition vitreuse du milieu intracellulaire (Tg'_i) et du milieu extracellulaire (Tg'_e) sont reportées.

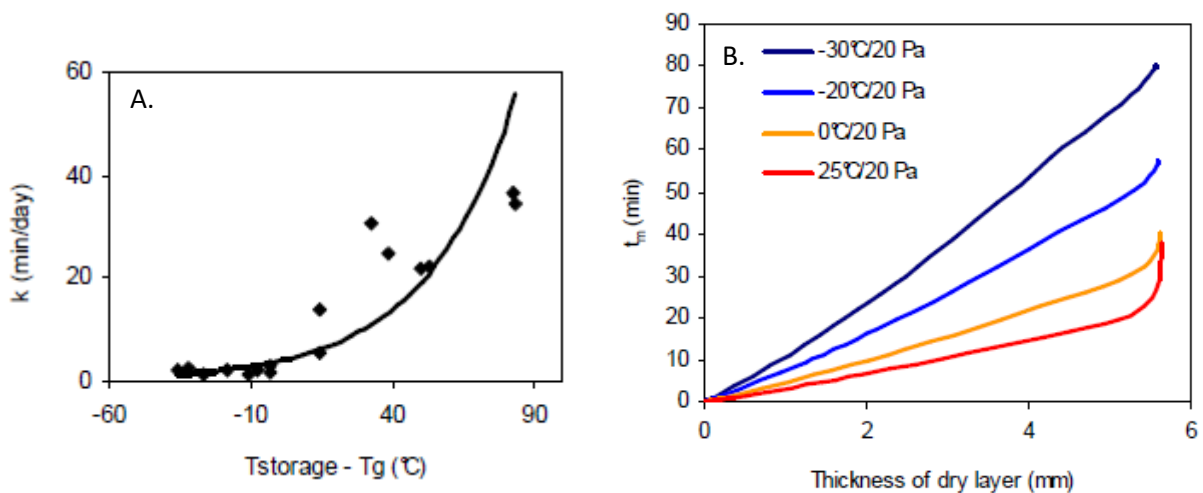


Figure 41 : A). Relation entre la perte d'activité acidifiante (k) de *L. bulgaricus* CFL1 lyophilisé dans une matrice à base de saccharose et la différence de température entre la température de stockage et la température de transition vitreuse (T_g). B). Simulation de l'évolution de l'activité acidifiante (t_m , temps nécessaire pour atteindre la vitesse d'acidification maximale) en fonction de l'épaisseur de la couche sèche, représentant l'avancée de l'étape de sublimation de la glace, pour différentes conditions opératoires de température étagère et de pression

La courbe rouge représente les conditions opératoires suivantes : 25 °C de température étagère et 20 Pa de pression.

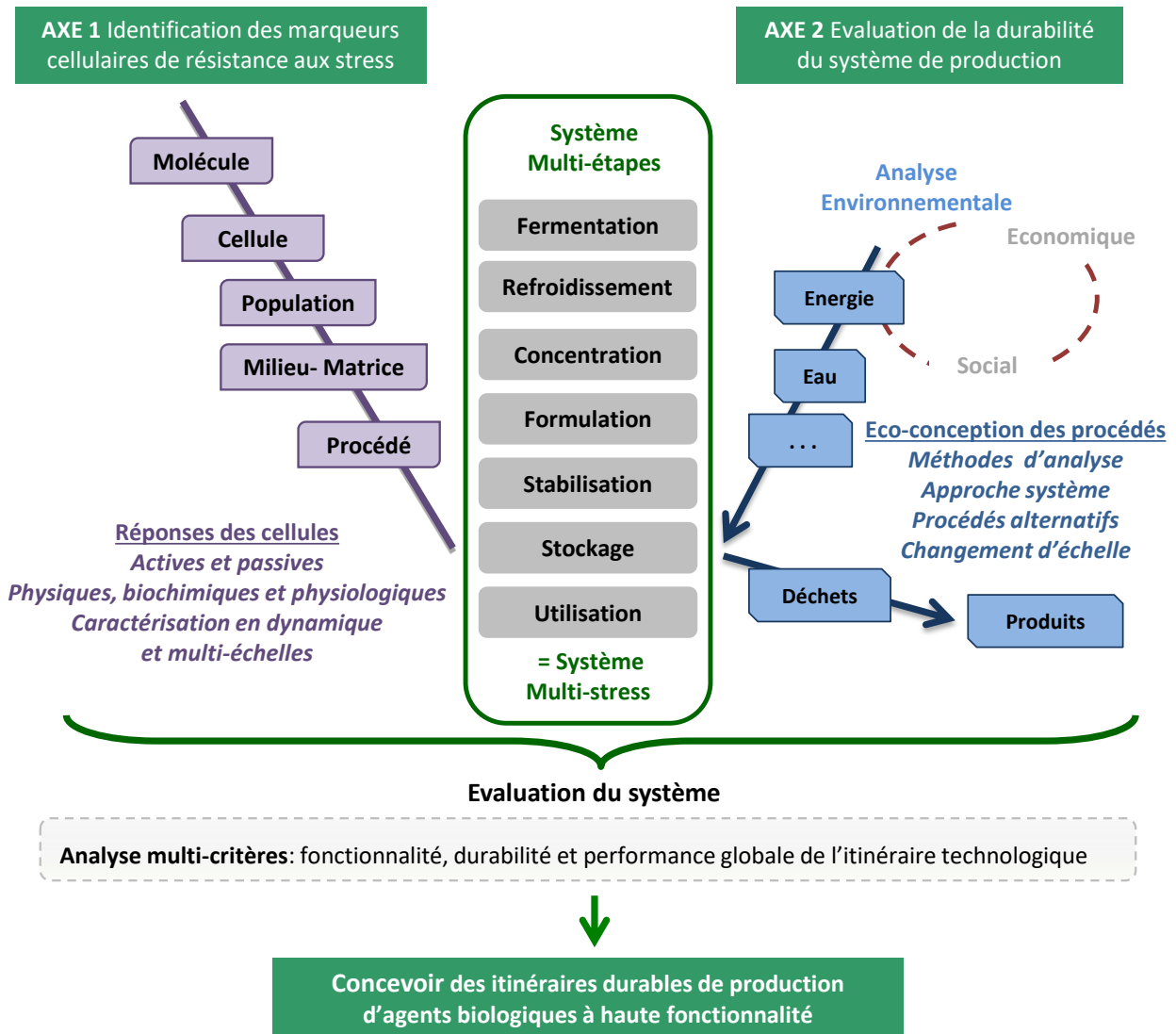


Figure 42 : Principales orientations de recherche

Tableau 4

	THESE H. VELLY	THESE J. GAUTIER	THESE J. MENEGHEL
Bactérie	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> TOMSC 161	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CFL1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CFL1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842
Procédé de stabilisation	Lyophilisation	Congélation	Congélation Exposition aux stress froid et osmotique
Paramètres de fermentation	Temps de récolte Température	Milieu de culture	Souche
METHODES DE CARACTERISATION BIOCHIMIQUES ET BIOPHYSIQUES			
Composition en acide gras	X	X	X
Spectroscopie IRTF	X	X	X
Fluidité membranaire	X	X	X
Déshydratation cellulaire		X	
Synchrotron SOLEIL Ligne SMIS		X	X
Synchrotron SOLEIL Ligne DISCO		X	X
Analyse protéomique et transcriptomique	X		
Articles publiés	Velly et al. (2015)	Gautier et al. 2013 Passot et al. 2014 Passot et al. 2015	Meneghel et al. 2016 Meneghel et al. 2017

Ligne SMIS : microspectroscopie IRTF / Ligne DISCO : cartographie cellulaire de la fluidité membranaire /
Déshydratation cellulaire estimée à partir de mesure du volume cellulaire déterminé par compteur Coulter

Tableau 5

	<i>L. lactis</i> (Thèse H. Velly)		<i>Lb bulgaricus</i> (Thèse J. Gautier)		<i>Lb bulgaricus</i> (Thèse J. Meneghel)	
	T4	T1	MRS	Whey	CFL1	ATCC
C16:0	56.4	50.5	18	38	37	27
C18:1	3.3	25.4	48	22	15	25
CyclC19:0	35.2	18.6	14	2	3	4
Other SFA	6.1	4.4	15	27	19	18
Other UFA	0.4	1.1	5	11	24	23
CFA/UFA	9.51	0.70	0.26	0.06	0.08	0.08
T _m (°C)	17	18	-5	37	18	7
r (25 °C)	0.169	0.145	0.139	0.212	0.188	0.169
RESISTANCE AU PROCEDE						
Congélation	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI
Lyophilisation	OUI	NON	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>