

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication :

**3 025 437**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

**14 58295**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **B 01 J 13/02** (2016.01), C 12 N 11/04, H 01 M 8/16,  
C 12 Q 1/04, G 01 N 27/327

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

⑫② Date de dépôt : 04.09.14.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 11.03.16 Bulletin 16/10.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *ESPCI INNOV — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *MOTTET LEOPOLD, BIBETTE  
JEROME, BREMOND NICOLAS et POULIN PHILIPPE.*

⑦③ Titulaire(s) : *ESPCI INNOV.*

⑦④ Mandataire(s) : *LAVOIX.*

⑤④ **CAPSULES A MEMBRANE CONDUCTRICE.**

⑤⑦ La présente invention concerne une capsule étant formée d'un coeur liquide et d'au moins une enveloppe gélifiée encapsulant totalement le coeur liquide à sa périphérie, ladite enveloppe gélifiée comprenant un matériau conducteur électrique; l'utilisation d'une telle capsule pour la production de bioréacteurs, le criblage de micro-organismes ou la réalisation d'une anode et/ou cathode de piles à bactéries ainsi qu'une méthode de criblage de bactéries électro-actives utilisant ladite capsule et un dispositif comprenant une telle capsule.

**FR 3 025 437 - A1**



## Capsules à membrane conductrice

La présente invention concerne une capsule formée d'un cœur liquide et d'au moins une enveloppe gélifiée encapsulant totalement le cœur liquide à sa périphérie, ladite enveloppe gélifiée comprenant un matériau conducteur électrique ; l'utilisation d'une telle capsule pour la production de bioréacteurs, le criblage de micro-organismes ou la réalisation d'une anode et/ou cathode de pile à bactéries ainsi qu'une méthode de criblage de bactéries électro-actives utilisant ladite capsule et un dispositif comprenant une telle capsule.

La limitation de la production de déchets ainsi que la question de leur valorisation, et plus particulièrement celle de la valorisation de leur énergie, est aujourd'hui une préoccupation majeure.

A l'heure actuelle, l'Union Européenne investit beaucoup dans le traitement des déchets.

Par ailleurs, le traitement des eaux usées aux États-Unis permet de générer 15 GW d'énergie (25 milliards de dollars) ce qui représente 3% de la puissance électrique des États-Unis.

Les déchets domestiques, industriels, ou d'origine animale représentent ainsi une puissance énergétique potentielle de 17 GW et une énergie de  $1,5 \cdot 10^{11}$  kWh.

Les piles microbiennes encore appelées piles à bactéries sont des dispositifs d'énergie verte remarquables qui exploitent les microorganismes afin de produire de l'électricité à partir de composés organiques comme les déchets. La bactérie se nourrit de déchets et en même temps, relargue des électrons.

Cependant, les piles à bactéries actuelles présentent certains inconvénients, et il existe un besoin d'amélioration de la production d'énergie par les piles bactériennes existantes, notamment par la recherche de micro-organismes plus électrochimiquement actifs.

La sélection d'organismes électro-actifs se fait actuellement en parallélisant des cultures dans des micro-puits muni d'une électrode (Hou, Han, & al *PlosOne* August 2009). Dans un domaine proche, la sélection à haut débit d'enzymes est faite grâce à des plaques de 96 puits (Song, O'Donohue *Bioresource Technology* 2010).

Les inventeurs de la présente invention ont mis au point une capsule pouvant encapsuler un objet électro-actif qui présente de nombreux avantages par rapport aux techniques de l'art antérieur de sélection de micro-organismes électro-actifs.

La capsule selon l'invention permet de compartimenter la culture donc de décorrélérer le bioréacteur du système de lecture de l'activité électrochimique des micro-organismes. Elle permet également une culture sur un temps plus long car la membrane de la capsule protège la culture des contaminations. De plus, et contrairement à ce qu'il est observé avec les cultures en micro-puit, la culture en capsule permet le renouvellement du milieu sans manipulations complexes telles que des centrifugations ou des pipetages multiples. Le renouvellement facilité du milieu élimine les problèmes liés à l'évaporation.

Par ailleurs, la capsule selon l'invention permet de connecter la culture à un système de lecture pour connaître les performances électrochimiques de l'organisme encapsulé.

Ainsi, la capsule selon l'invention apporte un outil nouveau à la culture de micro-organismes dans des capsules à cœur liquide en permettant d'agir de manière électrique sur l'organisme encapsulé.

La présente invention a donc pour objet une capsule comprenant un cœur liquide, une enveloppe gélifiée encapsulant totalement le cœur liquide à sa périphérie, l'enveloppe gélifiée étant propre à retenir le cœur liquide lorsque la capsule est plongée dans un gaz, une solution aqueuse ou une huile, l'enveloppe gélifiée comprenant au moins un polyélectrolyte gélifié et au moins un agent tensioactif, caractérisée en ce que l'enveloppe gélifiée comprend en outre un matériau conducteur électrique.

Par « matériau conducteur électrique », on entend un matériau capable de laisser passer un courant électrique, c'est-à-dire des électrons, et de véhiculer le courant, donc des électrons, d'un point à un autre.

En particulier, le matériau conducteur électrique consiste en des particules solides électriquement conductrices, plus particulièrement en des nanotubes de carbone, du noir de carbone ou du graphène.

Encore plus particulièrement, ledit matériau conducteur électrique est biocompatible.

Par « matériau biocompatible », on entend un matériau qui n'interfère pas, ni ne dégrade, le milieu biologique dans lequel il est utilisé.

Le cœur liquide de la capsule selon l'invention est constitué d'un liquide aqueux ou huileux pouvant contenir des molécules, microorganismes, ou autres objets de taille supérieure à la taille maximale des pores de la membrane (environ 20 nm).

Selon un aspect de la présente invention, le cœur liquide comprend au moins un objet électro-actif.

Par « objet électro-actif », on entend un objet électriquement actif ou réactif, capable d'échanger, de générer ou de capter des électrons ou encore de générer ou de capter un autre objet électro-actif.

5 En particulier, l'objet électro-actif est choisi parmi les micro-organismes, les cellules, les macromolécules et les molécules. Encore plus particulièrement, l'objet électro-actif est choisi parmi les bactéries du genre *Escherichia Coli*, *Geobacter*, *Shewanella*, *Rhodopseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*.

10 Dans le cadre de la présente invention, le cœur liquide de la capsule peut comprendre au moment de l'encapsulation des quantités variables de molécules, microorganismes, macromolécules et cellules qui seront adaptées en fonction de type d'objet encapsulé.

Par exemple, le cœur liquide de la capsule peut comprendre au moment de l'encapsulation une quantité de cellules supérieure ou égale à 1 cellule/capsule.

15 Il peut également comprendre au moment de l'encapsulation une quantité de microorganismes supérieure ou égale à 1microorganismes/capsule, de préférence supérieure à l'inoculum minimal. Pour chaque bactérie, il existe en effet un inoculum minimal qui correspond à la concentration minimale en bactérie qui permet à la culture de croître.

20 De préférence, le liquide contenu dans le cœur liquide est physiologiquement acceptable. Il peut notamment comprendre une solution saline, des macromolécules ou molécules, un viscosifiant physiologiquement acceptable et/ou un milieu de culture destiné à la croissance et/ou à la culture des micro-organismes ou des cellules.

25 Par « milieu de culture », on entend tout milieu, en particulier tout milieu liquide, susceptible de soutenir la croissance des cellules ou microorganismes. Pour l'encapsulation de bactéries, on utilise par exemple un cœur composé de 15% de PEG3500 et de 0.45% de NaCl, cette solution saline permettant de maintenir une osmolarité acceptable pour le microorganisme durant l'encapsulation, cette osmolarité étant similaire à celle du milieu de culture de la bactérie.

30 Le cœur liquide peut aussi comprendre des excipients physiologiquement acceptables, tels que des épaississants, ou des modificateurs de rhéologie. Ces épaississants sont par exemple des polymères, des cross-polymères, des microgels, des gommes ou des protéines, dont des polysaccharides, des celluloses, des polyosides, des polymères et co-polymères à base de silicone, des particules colloïdales (silice, argiles, latex, nanotubes de carbones biocompatibles...).

35 L'enveloppe gélifiée des capsules selon l'invention comprend un gel contenant de l'eau, au moins un polyélectrolyte réactif aux ions multivalents et le matériau conducteur

électrique. Selon l'invention, l'enveloppe contient en outre un agent tensioactif résultant de son procédé de fabrication, comme décrit par la suite.

Tout particulièrement, la capsule selon l'invention est obtenue à partir d'un procédé comprenant les étapes suivantes de :

- 5 a) convoyage séparé dans une double enveloppe d'une première solution liquide aqueuse ou huileuse et d'une deuxième solution liquide contenant un polyélectrolyte liquide propre à gélifier et le matériau conducteur électrique;
- 10 b) formation, à la sortie de la double enveloppe, d'une série de gouttes, chaque goutte comprenant un noyau central formé de ladite première solution et une pellicule périphérique formée de ladite deuxième solution et recouvrant totalement le noyau central;
- 15 c) immersion de chaque goutte dans une solution gélifiante contenant un réactif propre à réagir avec le polyélectrolyte de la pellicule pour le faire passer d'un état liquide à un état gélifié et former l'enveloppe gélifiée comprenant le matériau conducteur électrique, le noyau central formant le cœur liquide;
- d) récupération des capsules formées;

la deuxième solution contenant au moins un agent tensioactif avant son contact avec la première solution et donc avant son contact avec la solution gélifiante.

Plus particulièrement, ladite deuxième solution liquide contenant un polyélectrolyte liquide propre à gélifier et le matériau conducteur mentionnée à l'étape a) du procédé est formée par la mise en contact du matériau conducteur électrique sous forme dispersée et du polyélectrolyte propre à gélifier.

25 Encore plus particulièrement, l'enveloppe gélifiée est formée par un hydrogel de polysaccharide gélifié par ions divalents comprenant des particules solides électriquement conductrices sous forme dispersées et connectées formant ainsi un réseau électriquement conducteur.

30 Selon un des aspects de ce procédé, le rapport du débit de la première solution au débit de la deuxième solution à la sortie de la double enveloppe est compris entre 0.1 et 20, avantageusement entre 1 et 5, l'enveloppe gélifiée présentant une épaisseur comprise entre 1.6% et 55%, avantageusement entre 6% et 20% du diamètre de la capsule, après récupération des capsules formées.

35 Selon un autre aspect du procédé, les gouttes formées par coextrusion dans la double enveloppe tombent par gravité à travers un volume d'air dans la solution gélifiante.

Dans le cadre de la présente description, on entend par « tensioactif » une molécule amphiphile présentant deux parties de polarité différente, l'une lipophile et apolaire, l'autre hydrophile et polaire. Un tensioactif peut être de type ionique (cationique ou anionique), zwitterionique ou non ionique.

5 L'agent tensioactif est avantageusement un tensioactif anionique, un tensioactif non ionique, un tensioactif cationique ou un mélange de ceux-ci. La masse moléculaire de l'agent tensioactif est comprise entre 150 g/mol et 10000 g/mol, avantageusement entre 250 g/mol et 1500 g/mol.

10 Dans le cas où le tensioactif est un tensioactif anionique, il est par exemple choisi parmi un alkylsulfate, un alkyle sulfonate, un alkylarylsulfonate, un alkylphosphate alcalin, un dialkylsulfosuccinate, un sel d'alcalino-terreux d'acides gras saturés ou non. Ces tensioactifs présentent avantageusement au moins une chaîne hydrocarbonée hydrophobe présentant un nombre de carbones supérieur à 5, voire 10 et au moins un groupement anionique hydrophile, tel qu'un sulfate, un sulfonate ou un carboxylate lié à  
15 une extrémité de la chaîne hydrophobe.

Dans le cas où le tensioactif est un tensioactif cationique, il est par exemple choisi parmi un sel d'halogénure d'alkylpyridium ou d'alkylammonium comme le chlorure ou le bromure de n-éthylododecylammonium, le chlorure ou le bromure de cétylammonium (CTAB). Ces tensioactifs présentent avantageusement au moins une chaîne  
20 hydrocarbonée hydrophobe présentant un nombre de carbones supérieur à 5, voire 10 et au moins un groupement cationique hydrophile, tel qu'un cation d'ammonium quaternaire.

Dans le cas où le tensioactif est un tensioactif non ionique, il est par exemple choisi parmi des dérivés polyoxyéthylénés et/ou polyoxypropylénés des alcools gras, des acides gras, ou des alkylphénols, des arylphénols, ou parmi des alkyls glucosides, des  
25 polysorbates, des cocamides.

En particulier, l'agent tensioactif sera choisi dans la liste suivante : un alkylsulfate, un alkyle sulfonate, un alkylarylsulfonate, un alkylphosphate alcalin, un dialkylsulfosuccinate, un sel d'alcalino-terreux d'acides gras saturés ou non, un sel d'halogénure d'alkylpyridium ou d'alkylammonium comme le chlorure ou le bromure de n-  
30 éthylododecylammonium, le chlorure ou le bromure de cétylammonium, des dérivés polyoxyéthylénés et/ou polyoxypropylénés des alcools gras, des acides gras ou des alkylphénols, ou parmi des arylphénols, des alkyls glucosides, des polysorbates, des cocamides ou leurs mélanges.

Plus particulièrement, le pourcentage massique total en agent tensioactif dans la  
35 deuxième solution sera supérieur à 0,01% et est avantageusement compris entre 0,01% et 0,5% en masse.

Par « polyélectrolyte réactif aux ions polyvalents », on entend, au sens de la présente invention, un polyélectrolyte susceptible de passer d'un état liquide dans une solution aqueuse à un état gélifié sous l'effet d'un contact avec une solution gélifiante contenant des ions multivalents tels que des ions d'un métal alcalino-terreux choisis par exemple parmi les ions calcium, les ions baryum, les ions magnésium.

Dans l'état liquide, les chaînes individuelles de polyélectrolyte sont sensiblement libres de s'écouler les unes par rapport aux autres. Une solution aqueuse de 2% en masse de polyélectrolyte présente alors un comportement purement visqueux aux gradients de cisaillement caractéristiques du procédé de mise en forme. La viscosité de cette solution à cisaillement nul est entre 50 mPa.s et 10000 mPa.s, avantageusement entre 1000 mPa.s et 7000 mPa.s.

Les chaînes individuelles de polyélectrolyte dans l'état liquide présentent avantageusement une masse molaire supérieure à 65000 g/mole.

Dans l'état gélifié, les chaînes individuelles de polyélectrolyte forment, avec les ions multivalents, un réseau tridimensionnel cohésif qui retient le cœur liquide et empêche son écoulement. Les chaînes individuelles sont retenues les unes par rapport aux autres et ne peuvent pas s'écouler librement les unes par rapport aux autres. Dans cet état, la viscosité du gel formé est infinie. De plus, le gel a un seuil de contrainte à l'écoulement. Ce seuil de contrainte est supérieur à 0,05 Pa. Le gel possède également un module d'élasticité non nul et supérieur à 35 kPa.

Le gel tridimensionnel de polyélectrolyte contenu dans l'enveloppe emprisonne de l'eau et l'agent tensioactif.

Le polyélectrolyte est de préférence un polymère biocompatible inoffensif pour le corps humain. Il est par exemple produit biologiquement.

Avantageusement, il est choisi parmi les polysaccharides, polyélectrolytes de synthèse à base d'acrylates (polyacrylate de sodium, de lithium, de potassium ou d'ammonium, ou polyacrylamide), de polyélectrolytes de synthèse à base de sulfonates (poly(styrène sulfonate) de sodium, par exemple). Plus particulièrement, le polyélectrolyte est choisi parmi un alginat d'alcalino-terreux, tel qu'un alginat de sodium ou un alginat de potassium, une gellane ou une pectine.

Les alginates sont produits à partir d'algues brunes appelées «laminaires», désignées par le terme anglais « sea weed ».

De tels alginates présentent avantageusement une teneur en  $\alpha$ -L-gulonate supérieure à environ 50%, de préférence supérieure à 55%, voire supérieure à 60%.

En particulier, le ou chaque polyélectrolyte sera un polyélectrolyte réactif aux ions multivalents, notamment un polysaccharide réactif aux ions multivalents tel qu'un alginat

d'alcalin, une gellan ou une pectine, de préférence un alginate d'alcalin ayant avantageusement une teneur en bloc  $\alpha$ -L-gulonate supérieure à 50%, notamment supérieure à 55%.

5 Plus particulièrement, la teneur massique en polyélectrolyte dans la deuxième solution peut être inférieure à 5% en masse et est avantageusement comprise entre 0,5 et 3% en masse.

10 Selon un aspect de la présente invention, la capsule pourra comprendre en outre une enveloppe intermédiaire encapsulant totalement à sa périphérie le cœur liquide, ladite enveloppe intermédiaire étant elle-même encapsulée totalement à sa périphérie par l'enveloppe gélifiée.

15 Cette enveloppe intermédiaire liquide sera formée d'une composition intermédiaire comprenant un tampon ou un milieu de culture, et/ou un viscosifiant. En particulier, le viscosifiant sera un polymère hydrosoluble, tel que du Polyéthylène glycol (PEG), du dextran, de l'alginate en solution plus dilué que dans l'enveloppe extérieure ou encore de l'alginate plus dilué que dans l'enveloppe extérieure mélangé à un matériau conducteur électrique.

L'enveloppe intermédiaire est au contact du cœur et de l'enveloppe externe et maintient le cœur hors de contact de l'enveloppe externe.

20 La phase intermédiaire est utile pour stabiliser la capsule lors de sa formation, par exemple dans le cas où le cœur liquide contient du calcium susceptible d'induire trop tôt la gélification de la phase externe. En effet, selon leur composition, les milieux de culture peuvent interférer avec la polymérisation. Elle permet ainsi de séparer le cœur liquide de la phase externe à gélifier. Elle permet aussi de protéger le cœur liquide pendant la formation des gouttes, de l'alginate de la couche externe qui n'est pas encore polymérisé.

25 En particulier, le cœur liquide et la phase intermédiaire étant toutes deux liquides, celles-ci se mélangent à terme pour former le cœur liquide de la capsule.

La présence d'une telle enveloppe intermédiaire est notamment décrite dans l'article scientifique « Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane : liquid pearls », Bremond et al, Soft Matter, 2010, 2484-2488.

### 30 Production des gouttes

La production des gouttes selon le procédé selon l'invention mentionné précédemment est effectuée par convoyage séparé dans une double enveloppe d'une première solution liquide contenant la solution aqueuse ou huileuse dans laquelle est préférentiellement comprise un ou plusieurs micro-organismes, cellules, macromolécules ou molécules et d'une deuxième solution liquide contenant un polyélectrolyte liquide

35

propre à gélifier, le matériau conducteur électrique et au moins un agent tensioactif, le convoyage étant tel que décrit dans WO2010/063937.

Dans le cas de la présence supplémentaire d'une enveloppe intermédiaire, le convoyage séparé s'effectue dans une triple enveloppe, avec une troisième solution comprenant la solution intermédiaire.

A la sortie de la double (ou triple) enveloppe, les différents flux entrent en contact et se forme alors une goutte multi-composante, selon un mode hydrodynamique dit de « dripping » (goutte-à-goutte, décrit notamment dans WO 2010/063937) ou un mode dit de « jetting » (avec une instabilité de jet, décrit notamment dans FR 2012/2964017), selon la taille des capsules souhaitées.

Le premier flux constitue le cœur liquide et le deuxième flux constitue l'enveloppe externe liquide. Dans le cas de la présence de l'enveloppe intermédiaire, le deuxième flux constitue l'enveloppe intermédiaire liquide et le troisième flux l'enveloppe externe liquide.

Selon le mode de production, chaque goutte multi-composante se détache de la double (ou triple) enveloppe et chute dans un volume d'air, avant d'être immergée dans une solution gélifiante contenant un réactif propre à gélifier le polyélectrolyte de l'enveloppe externe liquide, pour former l'enveloppe externe gélifiée des capsules selon l'invention.

Selon certaines variantes, les gouttes multi-composantes peuvent comprendre des couches supplémentaires entre l'enveloppe externe et le cœur liquide, autre que l'enveloppe intermédiaire. Ce type de goutte peut être préparé par convoyage séparé de multiples compositions dans des dispositifs à multiples enveloppes.

#### Etape de gélification

Lorsque la goutte multi-composante entre en contact de la solution gélifiante, le réactif propre à gélifier le polyélectrolyte présent dans la solution gélifiante forme alors des liaisons entre les différentes chaînes de polyélectrolyte présentes dans l'enveloppe externe liquide, passant alors à l'état gélifié, provoquant ainsi la gélification de l'enveloppe externe liquide.

Sans vouloir être lié à une théorie particulière, lors du passage à l'état gélifié du polyélectrolyte, les chaînes individuelles de polyélectrolyte présentes dans l'enveloppe externe liquide se raccordent les unes aux autres pour former un réseau réticulé, aussi appelé hydrogel.

Dans le cadre de la présente description, le polyélectrolyte présent dans l'enveloppe externe gélifiée est à l'état gélifié et est également appelé polyélectrolyte à l'état gélifié ou encore polyélectrolyte gélifié.

Une enveloppe externe gélifiée, propre à retenir l'ensemble constitué par le cœur ou le cœur et l'enveloppe intermédiaire, est ainsi formée. Cette enveloppe externe gélifiée présente une tenue mécanique propre, c'est-à-dire qu'elle est capable de retenir le cœur liquide et, en cas de présence d'une enveloppe intermédiaire, d'entourer totalement l'enveloppe intermédiaire. Ceci a pour effet de maintenir la structure interne du cœur liquide et le cas échéant, de l'enveloppe intermédiaire.

Les capsules selon l'invention séjournent dans la solution gélifiante le temps que l'enveloppe externe soit complètement gélifiée, de préférence sans excéder 60 minutes, encore plus préférentiellement sans excéder 10 minutes.

On peut ensuite éventuellement éliminer la solution gélifiante et les capsules gélifiées peuvent ensuite éventuellement être collectées et plongées dans une solution aqueuse de rinçage, généralement essentiellement constituée d'eau, en particulier de l'eau physiologique, afin de rincer les capsules gélifiées formées. Cette étape de rinçage permet d'extraire de l'enveloppe externe gélifiée un éventuel excès du réactif propre à gélifier de la solution gélifiante, et tout ou partie du tensioactif (ou d'autres espèces) contenu initialement dans la deuxième solution liquide.

La présence d'un tensioactif dans la deuxième solution liquide permet d'améliorer la formation et la gélification des gouttes multi-composantes selon le procédé tel que décrit précédemment.

#### Caractéristiques des capsules gélifiées

Avantageusement, la capsule est de forme sphérique et présente un diamètre extérieur inférieur à 5 mm et compris notamment entre 0.3 mm et 4 mm.

De préférence, l'enveloppe externe gélifiée des capsules selon l'invention possède une épaisseur comprise de 32  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$ , de préférence de 120  $\mu\text{m}$  à 400  $\mu\text{m}$ , et avantageusement de 100  $\mu\text{m}$  à 350  $\mu\text{m}$ .

Les capsules selon l'invention présentent généralement un rapport volumique entre le cœur et l'ensemble des enveloppes intermédiaire et externe supérieur à 1, et de préférence inférieur à 5.

Selon un mode de réalisation particulier, les capsules selon l'invention présentent généralement un rapport volumique entre le cœur et l'ensemble des enveloppes intermédiaire et externe compris entre 1 et 5.

Ainsi, les capsules selon la présente invention sont utiles dans de nombreux secteurs d'activités comme par exemple celui des bioénergies, des piles bactériennes, enzymatiques ou encore dans celui de la fabrication d'électrodes.

Elles trouvent de nombreuses applications telles que la sélection de microorganismes électro-actifs ou la création d'énergie électrique à partir de déchets.

Ainsi, une capsule selon l'invention permet:

- 5 - la production à grande cadence de bio-réacteurs (1 bio-réacteur/seconde) ;
- le criblage de micro-organismes en permettant l'encapsulation d'une seule cellule qui donnera une colonie mono-clonale, les réservoirs et donc les cellules d'intérêts pouvant être ensuite choisis selon l'électro-activité ;
- la digitalisation, parallélisation et miniaturisation de la culture ;
- 10 - la récupération d'électrons et donc de l'énergie produite par une population de micro-organismes ;
- l'encapsulation d'espèces électrochimiques et le déclenchement de réactions internes à la capsule via le contact d'une électrode avec la membrane.
- la polarisation du réacteur pour permettre la croissance de micro-organismes sous un potentiel donné et ajustable

15 Selon un de ces aspects, la présente invention concerne donc également l'utilisation d'au moins une capsule selon l'invention, pour la production de bioréacteurs.

Elle concerne également l'utilisation d'au moins une capsule selon l'invention, pour le criblage de micro-organismes, en particulier de microorganismes électro-actifs, encore plus particulièrement de ceux choisis parmi : *Escherichia Coli*, *Geobacter*,  
20 *Rhodopseudomonas*, *Ochrobactrum* et *Enterobacter*.

La capsule selon l'invention peut donc constituer un outil de sélection d'organismes électro-actifs via l'encapsulation d'une cellule unique.

Par ailleurs, la conductivité de sa membrane permet le passage d'une électrode de l'intérieur vers l'extérieur de la capsule et inversement. La membrane permet donc la  
25 récupération d'électrons relargués dans le milieu extérieur par les organismes en culture.

Ainsi, la présente invention concerne également l'utilisation d'au moins une capsule selon l'invention, pour la récupération d'électrons produits par des micro-organismes, en particulier ceux choisis parmi : *Escherichia Coli*, *Geobacter*,  
*Rhodopseudomonas*, *Ochrobactrum* et *Enterobacter*.

30 La présente invention concerne également l'utilisation d'une capsule selon l'invention, pour la réalisation d'une anode et/ou d'une cathode de pile à bactéries.

Selon un de ces aspects, la présente invention concerne également une méthode de criblage de bactéries électro-actives comprenant la culture de bactéries contenues dans au moins une capsule selon l'invention telle que définie précédemment.

35 Les conditions de culture sont déterminées par l'homme du métier en fonction de chaque bactérie sur la base de ses connaissances générales.

Dans le cadre de la présente invention, les bactéries sont cultivées dans un milieu de culture comprenant un milieu de culture de base, celui-ci ayant pour caractéristique d'être capable de soutenir la croissance et le développement desdites bactéries, en particulier pour l'obtention d'une lignée monoclonale. Ce type de milieu de culture de base est bien connu de l'homme du métier. On peut citer par exemple le milieu LB Broth ou le milieu 826 de DMSZ.

Dans le cadre de la présente invention, lorsque la capsule doit comprendre une population monoclonale de bactéries, l'homme du métier pourra utiliser la loi de Poisson pour déterminer la concentration de bactéries à encapsuler pour obtenir une bactérie par capsule:

$$p(k) = P(X = k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

, dans laquelle :

- $\lambda$  est le nombre moyen de bactérie par volume de capsule ; et
- $P(k)$  est la probabilité qu'il y ait  $k$  bactéries dans une capsule connaissant la valeur de  $\lambda$ .

La valeur de  $\lambda$  dépend de la concentration  $C$  de cellules de la première solution exprimée en nombre de cellules par unité de volume, du diamètre  $D$  de la capsule et du rapport  $r_q$  des débits de la façon suivante :  $\lambda = \pi D^3 r_q C / 6$ .

Selon un autre de ces aspects, la présente invention concerne également un dispositif comprenant au moins une capsule selon l'invention et au moins une électrode, ladite au moins une électrode étant en contact avec l'enveloppe gélifiée de ladite au moins une capsule.

La présente invention sera illustrée plus en détail par les figures et exemples ci-dessous qui n'en limitent pas la portée.

## **FIGURES**

**Figure 1** : Gauche : Montage de formation de la bi-goutte composée de A au cœur et de B autour. Droite : Extrémité de l'injecteur permettant la formation de la bi-goutte. (A) Sortie pour le mélange A constituant le cœur de la capsule, (B) sortie pour le mélange B constituant la membrane de la future capsule.

**Figure 2** : Schéma du montage de fabrication des capsules à cœur liquide et à membrane conductrice ( $D=3\text{mm}$ ,  $h=350\mu\text{m}$ ,  $R=1,7\text{mm}$ ,  $H=5\text{cm}$ )

**Figure 3** : Capsules à cœur liquide et à membrane conductrice

**Figure 4 :** Evolution de la conductivité d'une capsule selon l'invention en fonction du pourcentage massique en nanotubes

**Figure 5 :** Schéma du montage d'encapsulation de bactéries avec une concentration de la solution de cœur réglée pour avoir une bactérie par capsule (D=3mm, h=350µm, R=1,7mm, H=5cm)

## EXEMPLES

### **Protocole de fabrication des capsules à cœur liquide et à membrane conductrice semi-perméable**

#### Création du mélange gélifiable :

Le mélange : 10 mL d'eau milliQ, 150 mg de nanotubes de carbone et 200 mg de SDS est dispersé sous ultrasons pendant 1h15 avec un sonicateur *Vibracell 75042 Bioblock Scientific* selon les paramètres suivant : Puissance = 35%Pmax ; Pulse : 3s on,1s off. La poudre d'alginate LF200FTS, 1% en masse, est ensuite ajoutée à la dispersion puis le tout est mis sous agitation magnétique pendant 12h afin d'obtenir la solution gélifiable.

#### Création du mélange à encapsuler :

Le mélange : 25 mL d'eau milliQ, 5,1g de polyéthylène glycol de masse molaire moyenne 3350 (PEG 3350 CAS 25322-68-3 *Sigma Aldrich*) et 135mg de NaCl sont mélangés sous agitation magnétique pendant 3h.

#### Création du bain de gélification :

1L d'eau milliQ, 10g de CaCl<sub>2</sub>, 50µL de tween20 à 10% en masse sont mélangés sous agitation magnétique pendant 3h.

#### Création de la capsule :

Une bi-goutte est créée avec le dispositif présenté en figures 1 et 2 selon la méthode décrite dans WO2010/063937.

Le mélange à encapsuler est placé dans la seringue A, il sortira du centre de l'injecteur (A) pour constituer le cœur de la future capsule.

Le mélange gélifiable est placé dans la seringue B, il sortira du bord de l'injecteur (B) pour constituer la membrane de la future capsule.

La création de la bi-goutte et ses paramètres sont contrôlés en contrôlant les débits des deux solutions (cœur et extérieur) via des pousses-seringues. Le débit de la seringue A est de 5mL/h, le débit de la seringue B est 5mL/h.

La bi-goutte est ensuite gélifiée en la faisant tomber dans le bain de gélification. La solution extérieure gélifie (l'alginate gélifie) et enferme le cœur liquide de la bi-goutte. La capsule est créée telle qu'illustrée en figure 3. La capsule est laissée dans le bain de gélification pendant 1h.

Description de la capsule :

Les débits pour la formation de la capsule sont de 5mL/h pour la solution extérieure (membrane) et de 5mL/h pour la solution intérieure (cœur).

5 L'injecteur a un diamètre de 3mm (D), il est placé à 5cm au-dessus du bain de gélification (H).

Pour ces débits, la capsule finale a un diamètre de 1,7mm (R), avec une membrane de 350µm d'épaisseur moyenne (h). Le cœur de la capsule a un volume de 11µL.

**Caractérisation de la conductivité du mélange gélifiable**

10 L'évolution de la conductivité du mélange gélifiable est mesurée à l'aide d'un impédancemètre (Materials Mate 7260) sur des billes de gels pleines à 10kHz, en fonction du pourcentage massique en nanotubes.

Création des mélanges gélifiable :

15 Le protocole de création des mélanges à différents pourcentages massique en nanotubes de carbone est le même que celui du protocole de création du mélange gélifiable de la création des capsules. Seule la masse de nanotubes change. 5 mélanges différents sont réalisés avec les masses de nanotubes suivantes : 0 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 mg correspondant respectivement aux pourcentages suivants : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2% en masse.

Création des billes de gels :

20 A l'aide d'une pipette pasteur plastique VWR de 7mL, les mélanges gélifiables sont faits goutter d'une hauteur de 5 cm dans le bain de gélification (identique à celui décrit précédemment). Les billes sont laissées à gélifier pendant 24h dans le bain. Les billes sont ensuite équilibrées dans une solution de CaCl<sub>2</sub> à 1mM pendant 48h pour dialyser le SDS présent dans le mélange gélifiable.

25 Des billes pleines de 3 mm de diamètre composées de 1% en masse d'alginate et de pourcentages massique de nanotubes de carbones variables sont ainsi obtenues.

Protocole de mesure :

30 Pour mesurer la conductivité, une bille est placée entre deux vis de 3mm de diamètres distantes de 2,7mm, connectée à l'impédancemètre. La conductivité à 10 kHz est mesurée.

Les résultats sont présentés en figure 4.

Les résultats montrent une augmentation de la conductivité du gel avec l'ajout des nanotubes. L'ajout de nanotubes de carbones permet d'augmenter jusqu'à 100 fois la conductivité de l'hydrogel.

35 **Protocole de fabrication de capsules comprenant des bactéries pour cultures monoclonales.**

Pour l'encapsulation des bactéries, l'ensemble des solutions utilisées sont stérilisés par filtration à 0,2µm. Le dispositif d'encapsulation est stérilisé thermiquement à 121 °C pendant 20 minutes par une autoclave (JSM table top sterilizer).

Création du mélange gélifiable :

- 5 1.7% en masse d'alginate LF200FTS et 5mM de SDS sont dissous dans 10 mL d'eau milliQ puis mis sous agitation magnétique pendant 12h pour obtenir le mélange gélifiable.

Création du bain de gélification :

1L d'eau milliQ, 10g de CaCl<sub>2</sub>, 50µL de tween20 à 10% en masse sont mélangés sous agitation magnétique pendant 3h.

- 10 Encapsulation monoclonale: Détermination de la *concentration monoclonale* permettant d'avoir une (ou moins) bactérie par capsule.

Pour préparer la solution de bactéries à la *concentration monoclonale*, la loi de Poisson est utilisée:

$$p(k) = P(X = k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}, \text{ dans laquelle :}$$

- 15 - λ est le nombre moyen de bactérie par volume de capsule ;  
 - P(k) est la probabilité qu'il y ait k bactéries dans une capsule connaissant la valeur de λ ; et  
 - le volume du cœur d'une capsule est de 11µL.

20 Ainsi, en appliquant cette loi avec 0,1 bactérie par capsule (9 bactéries/mL), 90% des capsules sont sans bactérie (p(0)), 9% des capsules obtenues sont monoclonales, c'est à dire avec une bactérie (p(1)), moins de 0.5% des capsules obtenues sont avec deux bactéries (p(2)) et moins 0.02% des capsules obtenues sont avec 3 bactéries, etc.

25 Ce protocole permet ainsi d'obtenir des capsules monoclonales avec un risque faible d'avoir des capsules contenant des bactéries issues d'une encapsulation non monoclonale (5% des capsules contenant des bactéries).

Création du mélange bactérien à encapsuler :

30 Le mélange : 8,3mL d'eau milliQ, 1,7g de polyéthylène glycol de masse molaire moyenne 3500 (PEG 3350 CAS 25322-68-3 *Sigma Aldrich*) et 45mg de NaCl sont mélangés sous agitation magnétique pendant 3h. On y ajoute ensuite 1mL de solution bactérienne composée de la bactérie à la concentration de 84 bactéries par millilitre dans son milieu de culture (voir ci-dessous).

35 Ainsi, une solution bactérienne comprenant des bactéries *E.coli* est préparée de la façon suivante : 2µL d'une souche de bactéries *E.coli* MC4100 YFP conservé à -80°C est ajouté à 10mL de LB Broth (Sigma). Le mélange est mis en culture sous agitation circulaire pendant 12h à 37°C. A 12h, la concentration en bactérie est évaluée par une mesure

d'absorbance à 600nm. La différence de densité optique observée à 600nm entre le milieu LB Broth et la culture bactérienne (Delta.D.O en unité de densité optique) permet d'obtenir la concentration en bactérie par millilitre via la formule : Concentration= Delta.D.O \*  $4.10^8$  bactéries/mL. Cette culture est ensuite diluée par dilutions successives dans du LB Broth pour atteindre la concentration de 84 bactéries/mL.

Ainsi, une solution bactérienne comprenant des bactéries *Geobacter* est préparée de la façon suivante : 1mL d'une souche de bactéries *Geobacter Sulfurreducens* fournie par DMSZ est ajouté à 9mL de son milieu spécifique (milieu 826 DMSZ) dans un tube hungate de 12 mL sous anaérobiose à 30°C pendant 4 jours. A 4 jours, la concentration en bactérie est évaluée par une mesure d'absorbance à 600nm. La différence de densité optique observée à 600nm entre le milieu de culture 826 et la culture bactérienne (Delta.D.O en unité de densité optique) permet d'obtenir la concentration en bactérie par millilitre via la formule : Concentration = Delta.D.O \*  $4.10^8$  bactéries/mL. Cette culture est ensuite diluée par dilutions successives dans du milieu 826 pour atteindre la concentration de 84 bactéries/mL.

#### Création de la capsule de culture monoclonale :

Une bi-goutte est créée avec le dispositif présenté dans les figures 1 et 5 selon la méthode décrite dans WO2010/063937.

Le mélange bactérien à encapsuler (préparé au choix avec des bactéries *E.Coli* ou *Geobacter* comme indiqué dans le paragraphe précédent) est placé dans la seringue A, il sortira du centre de l'injecteur (A) pour constituer le cœur de la future capsule.

Le mélange gélifiable est placé dans la seringue B, il sortira du bord de l'injecteur (B) pour constituer la membrane de la future capsule.

La création de la bi-goutte et ses paramètres sont contrôlés en contrôlant les débits des deux solutions (cœur et extérieur) via des pousses-seringues. Le débit de la seringue A est de 5mL/h, le débit de la seringue B est 5mL/h.

La bi-goutte est ensuite gélifiée en la faisant tomber dans le bain de gélification. La solution extérieure gélifie (l'alginate gélifie) et enferme le cœur liquide de la bi-goutte. La capsule est créée. La capsule est laissée dans le bain de gélification pendant 15min.

Les capsules sont ensuite mises en culture dans le milieu de culture de la bactérie encapsulée (cf paragraphe précédent) additionné de 5mM de CaCl<sub>2</sub>, et dans les conditions de culture applicables à la bactérie encapsulée. Après l'incubation, on obtient des capsules remplies de bactéries.

Les résultats de l'encapsulation monoclonale sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 :

Encapsulation monoclonale				
Bactérie encapsulée	Concentration moyenne bactéries/capsule à l'encapsulation ( $\lambda$ )	% théorique de capsules occupées	%expérimental de capsules occupées après mise en culture	Nombre total de capsules
<i>E.coli</i> MC4100 YFP	0,25	22	17	195
<i>Geobacter Sulfurreducens</i>	3	86	90	39

Ainsi, la capsule selon l'invention présente de nombreux avantages :

- 5 - Parallélisation possible et non limitée ;
- Croissance au temps long ;
- Récupération simplifiée de la totalité de la population cultivée (pas de centrifugation) ;
- Encapsulation possible d'un seul micro-organisme ;
- 10 - Possibilité d'actions de type électrique sur l'organisme encapsulé ;
- Manipulation simplifiée de la culture ; et
- bioréacteur dissocié du système de mesure courant.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Capsule comprenant un cœur liquide, une enveloppe gélifiée encapsulant totalement le cœur liquide à sa périphérie, l'enveloppe gélifiée étant propre à retenir le cœur liquide lorsque la capsule est plongée dans un gaz, une solution aqueuse ou une huile, l'enveloppe gélifiée comprenant au moins un polyélectrolyte gélifié et au moins un agent tensioactif, caractérisée en ce que l'enveloppe gélifiée comprend en outre un matériau conducteur électrique.
- 10 2. Capsule selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par la mise en œuvre d'un procédé comprenant les étapes suivantes de :
- 15 a) convoyage séparé dans une double enveloppe d'une première solution liquide aqueuse ou huileuse et d'une deuxième solution liquide contenant un polyélectrolyte liquide propre à gélifier et le matériau conducteur électrique;
- b) formation, à la sortie de la double enveloppe, d'une série de gouttes, chaque goutte comprenant un noyau central formé de ladite première solution et une pellicule périphérique formée de ladite deuxième solution et recouvrant totalement le noyau central;
- 20 c) immersion de chaque goutte dans une solution gélifiante contenant un réactif propre à réagir avec le polyélectrolyte de la pellicule pour le faire passer d'un état liquide à un état gélifié et former l'enveloppe gélifiée comprenant le matériau conducteur électrique, le noyau central formant le cœur liquide;
- d) récupération des capsules formées;
- 25 la deuxième solution contenant au moins un agent tensioactif avant son contact avec la première solution et donc avant son contact avec la solution gélifiante.
- 30 3. Capsule selon la revendication 2, dans laquelle ladite deuxième solution liquide contenant un polyélectrolyte liquide propre à gélifier et le matériau conducteur mentionnée à l'étape a) du procédé est formée par la mise en contact du matériau conducteur électrique sous forme dispersée et du polyélectrolyte propre à gélifier.
- 35 4. Capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une enveloppe intermédiaire encapsulant totalement à sa périphérie le cœur liquide, ladite enveloppe intermédiaire étant elle-même encapsulée totalement à sa périphérie par l'enveloppe gélifiée.

5. Capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle le cœur liquide comprend au moins un objet électro-actif.
- 5 6. Capsule selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le matériau conducteur électrique consiste en des particules solides électriquement conductrices.
- 10 7. Capsule selon la revendication 6, dans laquelle lesdites particules solides électriquement conductrices sont choisies parmi les nanotubes de carbone, le noir de carbone, le graphène.
- 15 8. Capsule selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, dans laquelle l'enveloppe gélifiée est formée par un hydrogel de polysaccharide gélifié par ions divalents comprenant lesdites particules solides électriquement conductrices sous forme dispersées et connectées formant ainsi un réseau électriquement conducteur.
- 20 9. Capsule selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit matériau conducteur électrique est biocompatible.
- 20 10. Capsule selon la revendication 5, dans laquelle ledit objet électroactif est choisi parmi les micro-organismes, les cellules, les macromolécules et les molécules.
- 25 11. Capsule selon la revendication 10, dans laquelle ledit micro-organisme est choisi parmi les bactéries du genre *Escherichia Coli*, *Geobacter*, *Shewanella*, *Rhodospseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*.
- 30 12. Utilisation d'au moins une capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour la production de bioréacteurs.
- 30 13. Utilisation d'au moins une capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour le criblage de micro-organismes, en particulier de microorganismes électro-actifs.
- 35 14. Utilisation d'au moins une capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour la récupération d'électrons produits par des micro-organismes.

15. Utilisation d'au moins une capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour la réalisation d'une anode et/ou d'une cathode de pile à bactéries.
- 5 16. Dispositif comprenant au moins une capsule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et au moins une électrode, ladite au moins une électrode étant en contact avec l'enveloppe gélifiée de ladite au moins une capsule.

1/3

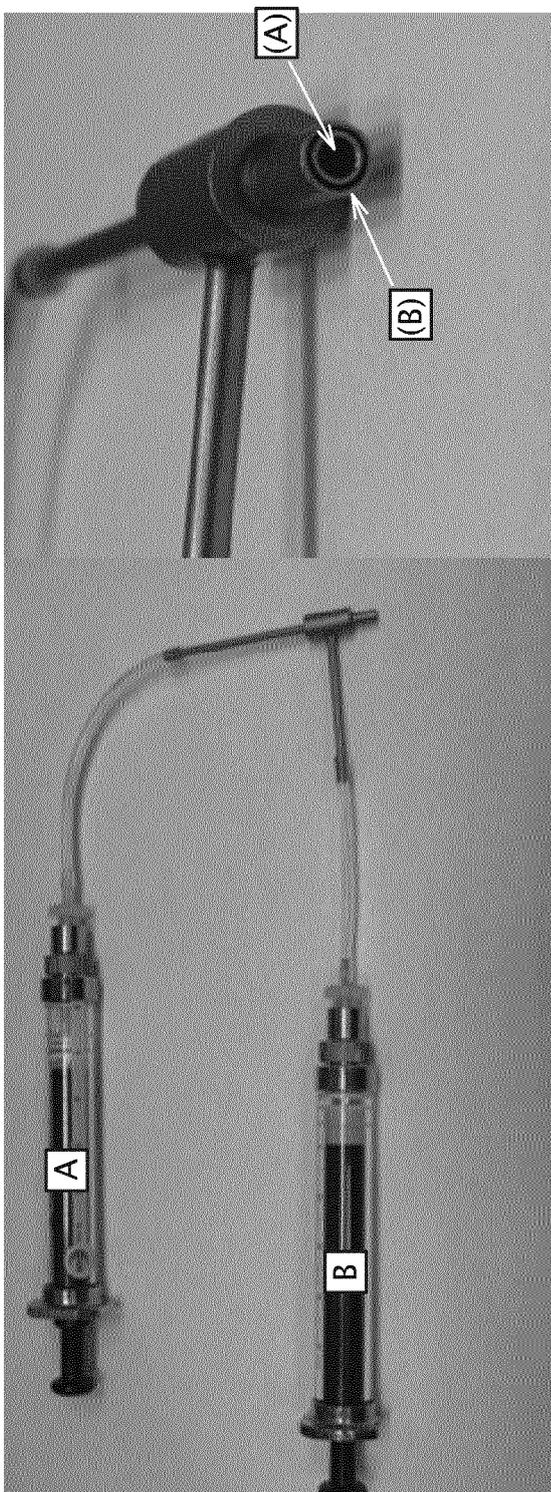
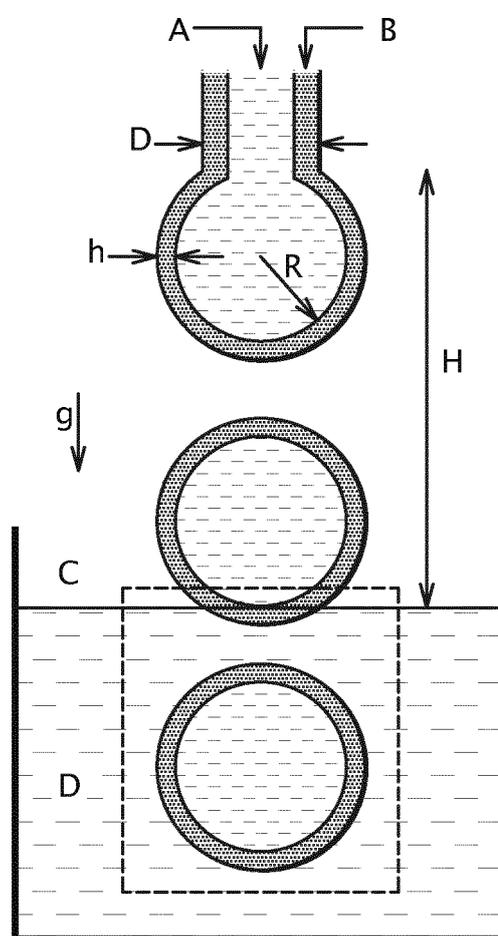
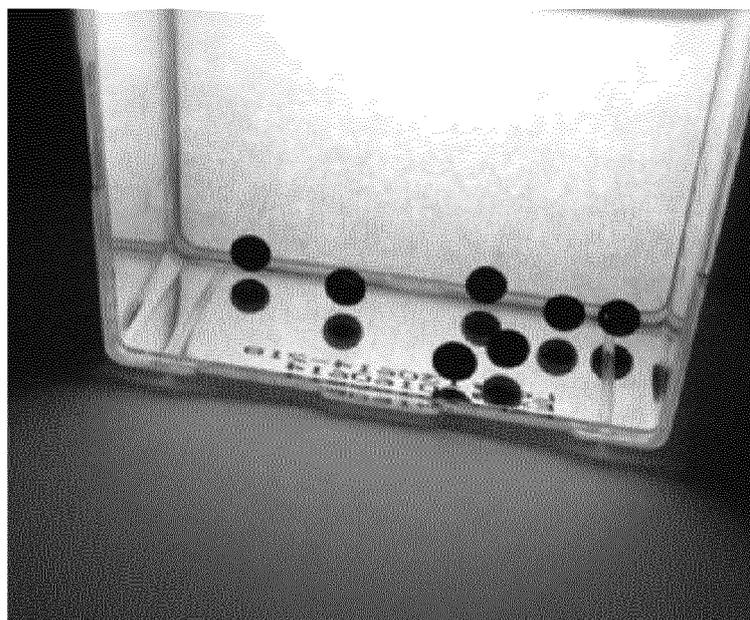
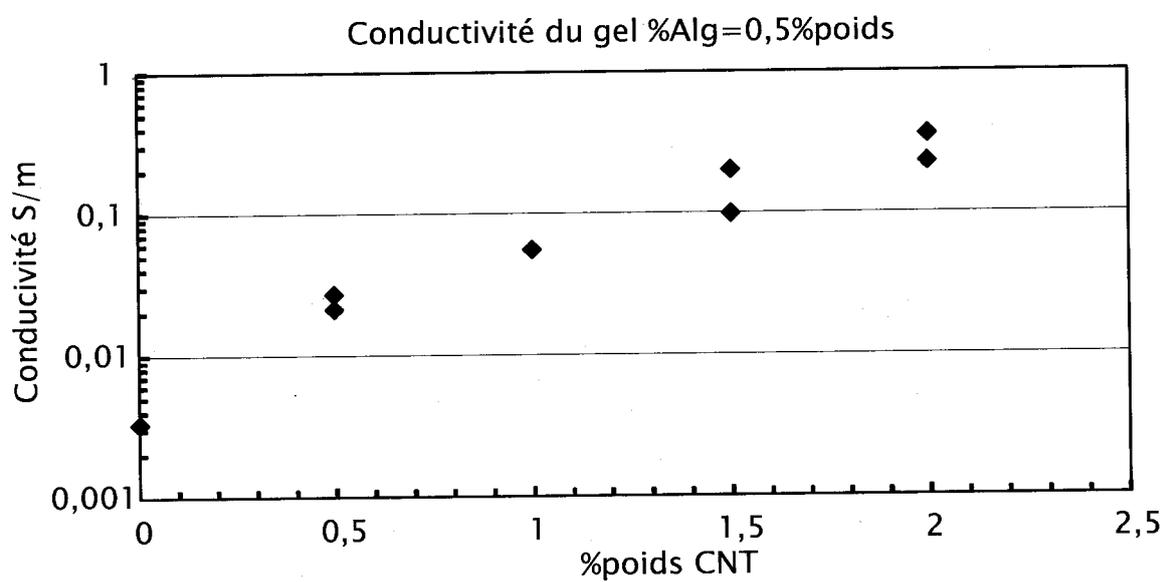
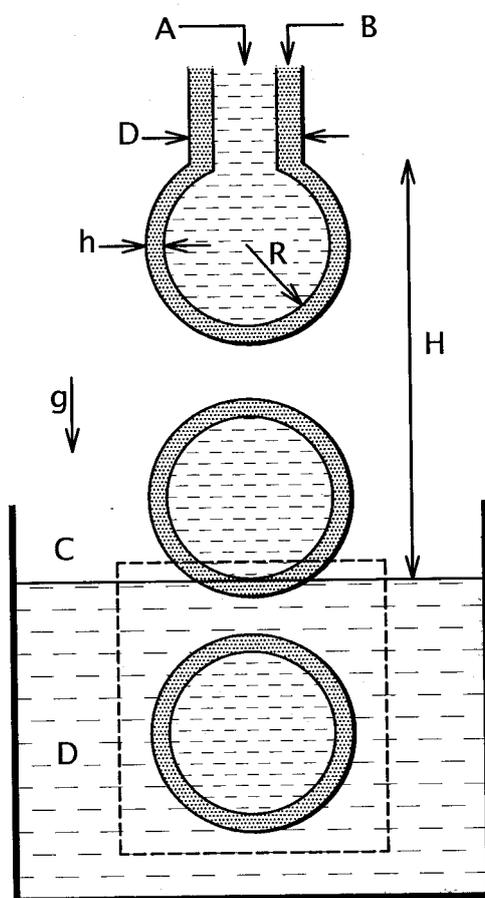


FIG.1

2/3

FIG.2FIG.3

3/3

FIG.4FIG.5





**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 802889  
FR 1458295

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	FR 2 939 012 A1 (CAPSUM [FR]) 4 juin 2010 (2010-06-04) * le document en entier * -----	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		18 mai 2015	Mc Donnell, Shane
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1458295 FA 802889**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **18-05-2015**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2986165	A1	02-08-2013	CN	104245114 A	24-12-2014
			EP	2809440 A2	10-12-2014
			FR	2986165 A1	02-08-2013
			US	2015017676 A1	15-01-2015
			US	2015072146 A1	12-03-2015
			WO	2013113830 A1	08-08-2013
			WO	2013113855 A2	08-08-2013
-----					
FR 2939012	A1	04-06-2010	CN	102300564 A	28-12-2011
			EP	2370066 A1	05-10-2011
			FR	2939012 A1	04-06-2010
			US	2012003285 A1	05-01-2012
			WO	2010063937 A1	10-06-2010
-----					