



HAL
open science

Hydrogel composite conducteur pour l'encapsulation de bactéries électroactives

Léopold Mottet

► **To cite this version:**

Léopold Mottet. Hydrogel composite conducteur pour l'encapsulation de bactéries électroactives. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066583 . tel-01419818

HAL Id: tel-01419818

<https://theses.hal.science/tel-01419818>

Submitted on 20 Dec 2016

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

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



**Thèse de Doctorat de
l'Université Pierre et Marie Curie**

Spécialité Physico-Chimie des Matériaux
(ED 388 - Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre)

Présentée par

M. LEOPOLD MOTTET

Pour obtenir le grade de

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

**Hydrogel composite conducteur pour l'encapsulation de bactéries
électroactives**

soutenance publique prévue le 18 Décembre 2015 devant le jury composé de :

Mme.	Valérie RAVAINÉ	Rapporteur
M.	Mathieu ETIENNE	Rapporteur
M.	Ludovic JULLIEN	Examineur
M.	Frédéric KANOUI	Invité
M.	Philippe POULIN	Examineur
M.	Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M.	Nicolas BREMOND	Co-Directeur de thèse



Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité Physico-Chimie des Matériaux

(ED 388 - Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre)

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

Présentée par

M. LEOPOLD MOTTET

Pour obtenir le grade de

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

Hydrogel composite conducteur pour l'encapsulation de bactéries électroactives

soutenance publique prévue le 18 Décembre 2015 devant le jury composé de :

Mme.	Valérie RAVAINÉ	Rapporteur
M.	Mathieu ETIENNE	Rapporteur
M.	Ludovic JULLIEN	Examineur
M.	Frédéric KANOUI	Invité
M.	Philippe POULIN	Examineur
M.	Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M.	Nicolas BREMOND	Co-Directeur de thèse

Table des matières

Introduction	7
I L'essor des biotechnologies dans le domaine des piles bactériennes	9
I.1 Les piles à bactéries	10
I.1.1 Principe de fonctionnement	10
I.1.2 Le genre <i>Geobacter</i>	12
I.1.2.1 Le métabolisme de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	12
I.1.2.2 Exemple d'une demi-pile bactérienne : anode en carbone graphite/ <i>Geobacter sulfurreducens</i>	13
I.1.2.3 Les interactions entre <i>G.sulfurreducens</i> et les électrodes	14
I.2 Les axes de recherche dans le domaine des piles à bactéries	15
I.2.1 Des électrodes innovantes	16
I.2.2 Étude des interactions entre espèces	17
I.2.3 Sélection de nouveaux micro-organismes électroactifs	18
I.2.4 "Going small", les avantages des biopiles de taille milli et micrométrique	19
I.2.5 Vers un nouvel outil de sélection de micro-organismes électroactifs	20
I.3 La capsule à cœur liquide : un outil original pour l'étude de micro-organismes	21
I.3.1 Un outil à l'échelle millifluidique	21
I.3.2 La capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel	22
I.3.2.1 Fabrication de la capsule à cœur liquide	22
I.3.2.2 Un outil adapté à la culture cellulaire	25
I.3.3 Vers une capsule à membrane conductrice	26
I.4 Objectifs	26
II Un hydrogel composite conducteur : formulation et propriétés	29
II.1 Un double réseau d'hydrogel et de charges dispersées	30
II.1.1 Généralités sur les hydrogels	30
II.1.2 Les hydrogels conducteurs	31
II.1.3 Stabilité colloïdale de dispersions de particules solides	32
II.1.4 Choix des matériaux	35
II.1.4.1 L'alginate, un polysaccharide biocompatible gélifiable	35
II.1.4.2 Les nanotubes de carbone	37
II.1.4.3 Un éventail de tensioactifs	39

Table des matières

II.2	Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel	40
II.2.1	La dispersion des nanotubes par ultrasonication en présence de tensioactif	40
II.2.2	Étude de l'adsorption des tensioactifs étudiée par tensiométrie	42
II.2.2.1	Effet des tensioactifs sur la tension de surface	42
II.2.2.2	Mesure de la CMC par la méthode de la goutte pendante . .	44
II.2.2.3	Décalage de la CMC induit par les nanotubes de carbones . .	45
II.2.2.4	Calcul de l'aire par tête polaire à la surface des MWNT . . .	45
II.2.3	Les mélanges Alginate/Nanotubes de carbone	47
II.2.3.1	Déstabilisation d'une dispersion de nanotubes par ajout d'alginate de sodium	48
II.2.3.2	Propriétés rhéologiques des mélanges Alginate/MWNT . . .	49
II.2.4	Protocole complet de fabrication de billes Alginate/MWNT	51
II.3	Caractérisation de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par impédancemétrie .	53
II.3.1	Mesure de conductivité par impédancemétrie	53
II.3.2	Mesures brutes d'impédancemétrie	53
II.3.2.1	Influence des nanotubes sur l'impédance de l'hydrogel	53
II.3.3	Influence du fond ionique sur l'impédance de l'hydrogel	54
II.3.4	Modèle équivalent du système Alginate/MWNT/fond ionique.	55
II.3.5	Approximation des courbes réelles par le modèle théorique	57
II.3.6	Conductivité des autres hydrogels Alginate/MWNT-Brij	60
II.3.7	Conclusion sur la mesure d'impédance	61
II.4	Conclusion	61
III	Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie	63
III.1	Une électrode à l'échelle macroscopique	64
III.1.1	La mesure électrochimique par voltampérométrie	64
III.1.1.1	La réaction électrochimique	64
III.1.1.2	Le transfert électronique	65
III.1.1.3	Le transport de masse à l'électrode	67
III.1.1.4	La voltampérométrie cyclique	68
III.1.2	Présentation du dispositif expérimental et exemple d'une voltampérométrie cyclique effectuée <i>via</i> un hydrogel conducteur	70
III.1.2.1	Un système à trois électrodes	70
III.1.2.2	Le ferrocène méthanol	71
III.1.2.3	Une mesure voltampérométrique sur une bille Alginate/MWNT	72
III.1.3	Dialyse du tensioactif et connexion interne de l'hydrogel	75
III.1.3.1	Évolution du courant de pic d'oxydation	75
III.1.3.2	Évolution des voltampérogrammes durant la dialyse	77
III.1.3.3	Vers un suivi cinétique de la désorption du tensioactif	79
III.1.4	Augmentation du courant de pic d'oxydation en fonction du pourcentage MWNT	80
III.2	Étude de l'hydrogel par microscopie électrochimique	82

III.2.1	La microscopie électrochimique (SECM)	83
III.2.1.1	Principe de fonctionnement	83
III.2.1.2	Le mode <i>Feedback</i>	83
III.2.1.3	Les courbes d'approche	84
III.2.1.4	Le mode <i>Feedback</i> sur un substrat non connecté	86
III.2.2	Approche de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par SECM	86
III.2.2.1	Protocole et dispositif de mesure SECM	86
III.2.2.2	La mesure de SECM sur des hydrogels perméables	87
III.2.2.3	Évolution du <i>feedback</i> en fonction du pourcentage de MWNT	89
III.2.2.4	Suivi de la dialyse du tensioactif par SECM	90
III.2.3	Imager la conductivité de surface	91
III.3	Conclusion	92
IV	Une capsule "anode" de piles bactérienne.	95
IV.1	Étude de la croissance bactérienne compartimentée	96
IV.1.1	Étude de la croissance d'une bactérie modèle encapsulée, <i>Escherichia coli</i>	96
IV.1.1.1	La bactérie <i>Escherichia coli</i> , culture et croissance	96
IV.1.1.2	Protocole d'encapsulation et de culture de <i>E. coli</i>	99
IV.1.1.3	Encapsulation monoclonale	100
IV.1.1.4	Suivi de la croissance de bactéries encapsulées	103
IV.1.1.5	Les limites possibles de la croissance encapsulée	104
IV.1.2	Étude de la croissance encapsulée de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	106
IV.1.2.1	La culture de <i>G. sulfurreducens</i>	106
IV.1.2.2	Croissance de <i>G. sulfurreducens</i> en solution	106
IV.1.2.3	Encapsulation et croissance de <i>G. sulfurreducens</i>	107
IV.1.2.4	Encapsulation et croissance de <i>G. sulfurreducens</i> dans une capsule à membrane conductrice	108
IV.2	Production d'un courant électrique par <i>G. sulfurreducens</i> attachée à une électrode composite Alg/MWNT	110
IV.2.1	Dispositif de connexion électrique et de mesure de courant	110
IV.2.2	Courant généré par <i>G. sulfurreducens</i>	111
IV.3	La capsule "anode", un outil compartimenté pour sonder l'électroactivité bactérienne	114
IV.3.1	Dispositif de connexion d'une capsule à membrane conductrice	114
IV.3.2	Mesure de l'électroactivité d'une population de <i>G. sulfurreducens</i> encapsulée	115
IV.4	Conclusion	117
Conclusion Générale		119
Annexes		123

Table des matières

A Calcul du coefficient de partage H_2O /Alginate et du coefficient de diffusion du Ferrocène méthanol dans l'alginate	123
B Article : Multiscale electrochemistry of hydrogels embedding conductive nanotubes	127
C Milieu de culture 826	135
Bibliographie	148

Introduction

Le changement climatique et les réserves limitées en pétrole et en gaz guident le monde de la recherche vers l'étude et le développement d'alternatives énergétiques. Les énergies fossiles se raréfiant, leur prix ne cesse d'augmenter. Par conséquent, les énergies dites "renouvelables" telles que l'énergie éolienne ou solaire sont de plus en plus compétitives. Afin d'optimiser les coûts énergétiques, des voies de valorisation des déchets ont également été développées par des procédés comme le recyclage ou le compostage.

Les eaux usées industrielles, animales et domestiques, sont encore peu considérées dans ces logiques de valorisation. Chaque jour, un français consomme entre 100 et 200 litres d'eau potable. Ce volume important doit, bien entendu, être traité avant d'être rejeté dans la nature. Ces traitements entraînent des coûts énergétiques importants. En 2012, les États-Unis ont dépensé 3 % de leur puissance électrique dans le traitement des eaux usées [78]. Des études montrent que ces déchets représentent une source d'énergie au moins équivalente à leur coût de purification [76]. La valorisation des eaux usées est notamment possible par l'utilisation de micro-organismes. Récemment, le développement de piles microbiennes a permis de convertir des déchets issus d'eaux usées en énergie électrique par l'action de micro-organismes dits "électroactifs". Les principes de fonctionnement de ces dispositifs électrochimiques sont connus. Cependant leur faible efficacité et leur temps de vie limité rendent les applications difficiles. Aujourd'hui, les piles à bactéries fournissent typiquement des densités de puissance de l'ordre de quelques $W.m^{-2}$. Elles sont pour l'instant 100 fois moins performantes que les piles à hydrogène.

Le développement de piles microbiennes performantes est en lien direct avec la découverte de micro-organismes capables de convertir efficacement de la biomasse en énergie. Nous pensons que l'immense diversité génétique et phénotypique des micro-organismes laisse entrevoir un potentiel caché que les technologies classiques ne peuvent explorer. Nous nous sommes donc orientés vers le développement d'un outil permettant d'isoler des bactéries et de sonder leur efficacité dans la conversion de substrats organiques en électricité. Ces travaux de thèse portent sur la formulation et la caractérisation de cet outil de criblage ainsi que son application dans l'étude de bactéries électroactives.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à la description générale des piles à bactéries et à leur principe de fonctionnement. Nous développons particulièrement les axes de recherches permettant d'améliorer les performances de ces dispositifs microbiens. Enfin nous exposons la fabrication de capsules à cœur liquide et à membrane d'hydrogel. Cette technologie

développée au laboratoire depuis quelques années permet la création en série de bioréacteurs. Ces capsules sont la base de notre outil de culture et d'étude.

Dans la suite, nous présentons la formulation et la caractérisation d'un hydrogel composite conducteur. Cet hydrogel a pour but d'adapter les capsules à cœur liquide à l'étude de l'électroactivité des bactéries encapsulées. L'hydrogel est formulé en regard des contraintes liées à la fabrication des capsules et de leur application en microbiologie. Sa conductivité est ensuite caractérisée par impédancemétrie.

Le chapitre suivant traite de l'étude de l'hydrogel composite par voie électrochimique. Cette approche permet d'utiliser notre matériau comme une électrode afin d'observer sa capacité à faire transiter des électrons lorsqu'il est connecté électriquement et placé sous potentiel. La microscopie électrochimique a ensuite été utilisée pour imager la conductivité de surface de ce matériau composite.

Dans une dernière partie, nous exposons l'utilisation de notre hydrogel conducteur pour la récupération d'électrons générés par une population bactérienne électroactive. L'hydrogel est alors utilisé pour constituer la membrane d'une capsule à cœur liquide. Après avoir étudié la croissance des bactéries dans ces bioréacteurs, nous présentons la preuve de concept de notre outil d'étude de bactéries électroactives. Une capsule à membrane conductrice contenant des bactéries est connectée électriquement. Nous montrons alors qu'il est possible de récupérer le courant généré par la population encapsulée afin d'estimer l'efficacité des bactéries électroactives isolées.

Chapitre I

L'essor des biotechnologies dans le domaine des piles bactériennes

Sommaire

I.1	Les piles à bactéries	10
I.1.1	Principe de fonctionnement	10
I.1.2	Le genre <i>Geobacter</i>	12
I.2	Les axes de recherche dans le domaine des piles à bactéries	15
I.2.1	Des électrodes innovantes	16
I.2.2	Étude des interactions entre espèces	17
I.2.3	Sélection de nouveaux micro-organismes électroactifs	18
I.2.4	"Going small", les avantages des biopiles de taille milli et micrométrique	19
I.2.5	Vers un nouvel outil de sélection de micro-organismes électroactifs	20
I.3	La capsule à cœur liquide : un outil original pour l'étude de micro-organismes	21
I.3.1	Un outil à l'échelle millifluidique	21
I.3.2	La capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel	22
I.3.3	Vers une capsule à membrane conductrice	26
I.4	Objectifs	26

Les piles électrochimiques reposent sur le principe de conversion d'énergie chimique en énergie électrique. Elles sont généralement composées de deux réservoirs connectés par une membrane échangeuse d'ions. L'un des deux réservoirs constitue une source d'électrons. Il est appelé anode. L'anode est le siège d'une oxydation génératrice d'électrons. L'autre réservoir, accepteur d'électrons, est appelé cathode. La cathode est le siège d'une réduction. Lorsque la cathode et l'anode sont connectées électriquement, un débit d'électrons s'établit entre les deux réservoirs. La pile génère alors du courant électrique. La libération d'électrons à l'anode est le fruit de la réaction d'oxydation d'une espèce. Cette source d'électrons peut être choisie dans un large panel allant d'éléments simples comme le zinc à des macromolécules comme

les polymères red/ox [44]. L'oxydation de molécules complexes nécessite parfois l'action de catalyseurs facilitant la libération d'électrons à l'anode. Lorsque ces catalyseurs sont ceux du métabolisme de bactéries vivantes, on parle alors de pile à bactéries, communément appelée MFC (Microbial Fuel Cell).

I.1 Les piles à bactéries

La première pile microbienne est créée en 1911 par M. Potter, professeur de botanique à l'université de Durham [69]. Il démontre le passage d'un courant électrique entre deux électrodes immergées respectivement dans un milieu bactérien et un milieu stérile. À partir des années 60, la recherche sur les MFC s'accélère avec l'intérêt grandissant de la conversion de déchets organiques en énergie. Cependant les énergies produites restent limitées [69]. Au début du XXIe siècle, les MFC apparaissent enfin comme une alternative possible pour la production d'électricité, notamment grâce à un travail considérable sur l'architecture des électrodes et l'identification de bactéries tels que *G. sulfurreducens* ou *Shewanella*. Après une présentation du principe de fonctionnement des piles à bactéries, ces deux composants de la biopile seront abordés dans la suite de ce chapitre introductif.

Il existe une grande diversité de MFC. Elles diffèrent principalement par leur nombre de chambres réactionnelles et l'ajout ou non de molécules médiatrices, parfois toxiques, facilitant les transferts électroniques. Dans la suite de ces travaux, nous nous intéresserons aux piles bactériennes constituées de deux chambres réactionnelles (anode et cathode séparées par une membrane échangeuse d'ions (figure I.1) et ne nécessitant pas l'ajout de médiateurs red/ox.



FIGURE I.1 – Photo d'une pile à bactérie conventionnelle. À gauche l'anode reliée par une membrane échangeuse de proton à la cathode à droite (Crédits : www.igem.org).

I.1.1 Principe de fonctionnement

Le principe général de fonctionnement d'une pile à bactéries (MFC) est exposé sur la figure I.2. Elle est composée d'une anode abritant les micro-organismes et d'une cathode séparées par une membrane échangeuse de protons.

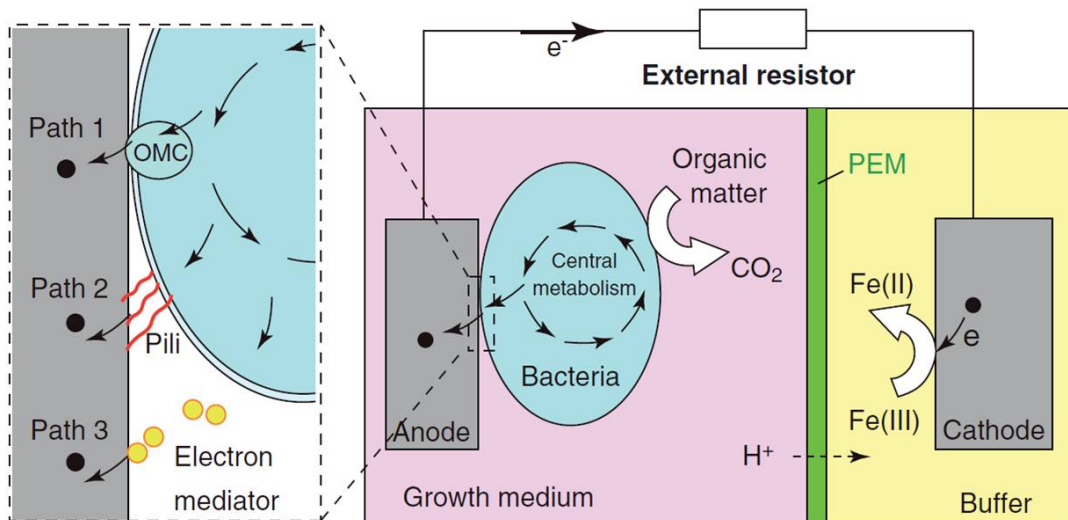


FIGURE I.2 – Fonctionnement schématique d'une pile à bactéries à deux chambres [104].

Certaines bactéries sont capables de catalyser l'oxydation d'un substrat organique. Une fois passée la membrane cellulaire, le substrat est métabolisé par la bactérie *via* des cycles d'oxydo-réduction propres à chaque espèce et à chaque substrat. Au cours de ces cycles, du CO_2 et des électrons sont produits. Une partie de ces électrons est évacuée hors de la bactérie et transmise à une électrode par différents modes de transfert.

L'électron peut être transmis directement de la bactérie à l'électrode *via* des hémoprotéines présentes à la surface de la cellule, les cytochromes C (Mehta et al. [88]). Les cytochromes C possèdent un ion fer au cœur de leur hème qui peut subir une oxydation ou une réduction. C'est ce cœur métallique qui permet le transfert électronique. Lorsqu'elle n'est pas en contact direct avec l'électrode, la bactérie peut également synthétiser des pilis conducteurs. Ces pilis lui permettent d'adhérer à l'électrode et de transférer des électrons sur des distances pouvant aller jusqu'à $20 \mu\text{m}$ [107]. Enfin, certaines espèces sont capables de sécréter des médiateurs électroniques. Ces molécules sont sécrétées sous leur forme réduite. Elles diffusent jusqu'à l'électrode pour y subir une oxydation et libérer un électron à l'anode (Marsili et al. [85]).

Une fois transmis à l'électrode, les électrons circulent vers la cathode, générant du courant. La molécule réduite à la cathode peut être choisie parmi un nombre important d'espèces oxydo-réductrices. La différence de potentiel entre l'anode et la cathode doit être suffisante pour permettre le transfert électronique entre la bactérie et l'anode. Dans la littérature, cette différence est typiquement de l'ordre de $0,2 \text{ V} - 0,4 \text{ V}$ [16, 111]. Il convient donc de choisir l'espèce red/ox de la cathode en fonction de son potentiel chimique. Dans les MFC, les couples oxydant/réducteur de la cathode utilisés sont souvent $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ou $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ [133]. Pour maintenir l'électro-neutralité, des protons diffusent à travers la membrane échangeuse de protons.

Notons ici que le dioxygène ne doit pas être présent dans la chambre anodique. En effet, si les électrons sécrétés par la bactérie participent à la réduction du dioxygène dans milieu de culture. Ils ne transitent plus dans le circuit et la production de courant est nulle [72]. La

chambre anodique doit donc être en milieu anaérobie.

Le fonctionnement de la cathode restant relativement classique, nous nous focaliserons dans la suite de ces travaux de thèse, sur la partie anodique de la pile à bactéries.

Le fonctionnement des piles à bactéries repose donc sur l'activité métabolique de micro-organismes. Parmi les micro-organismes utilisés dans les MFC, le genre *Geobacter* est le plus étudié à l'heure actuelle car le plus prometteur. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les MFC, il est intéressant de décrire en détails le fonctionnement de *Geobacter* dans les piles à bactéries.

I.1.2 Le genre *Geobacter*

Geobacter metallireducens a été découvert en 1987 par le professeur Derek Lovley à Washington D.C, dans des sédiments du fleuve Potomac . Ces bactéries peuvent oxyder des métaux ou de la matière organique lorsqu'elles sont en milieu anaérobie. *Geobacter metallireducens* est le premier organisme découvert capable de réaliser la réduction d'oxydes de métaux insolubles à partir de l'oxydation de l'acétate, un produit primaire de la fermentation [80]. Dans un premier temps, *Geobacter* a représenté une solution possible pour la bioremédiation de contaminants de milieux souterrains.

En 2001, Reimers et al. [109] constatent la possibilité de construire un nouveau type de piles à bactéries. En connectant une électrode immergée dans des sédiments marins à une électrode similaire exposée à de l'oxygène, ils observent la production durable d'énergie électrique. À la suite de ces travaux, Bond, Tender et Lovley analysent les biofilms attachés aux anodes de ce nouveau type de MFC [15]. Ils découvrent alors que les micro-organismes présents dans le biofilm développé sur l'électrode appartiennent en majorité à la famille des *Geobacteraceae*. Des recherches complémentaires sur des espèces de cette famille, comme *Desulfuromonas acetoxidans* et *Geobacter metallireducens*, permettent de suggérer que *Geobacter* est capable d'oxyder des composés organiques et de transférer par contact direct à l'électrode les électrons issus de la métabolisation oxydative [15]. Ce transfert électronique direct sans ajout de médiateur soluble fait de *Geobacter* le genre le plus prometteur en terme d'efficacité au début des années 2000.

I.1.2.1 Le métabolisme de *Geobacter sulfurreducens*

En 2003, le séquençage du génome de l'espèce *G. sulfurreducens* marque le point de départ d'avancées considérables dans la compréhension du métabolisme du genre *Geobacter* [90]. Aujourd'hui ses principaux cycles métaboliques sont compris [84].

La figure I.3 expose schématiquement la métabolisation de l'acétate au cours du cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques. Ce cycle est utilisé par *G. sulfurreducens* pour réduire des intermédiaires énergétiques permettant par la suite la production d'ATP. Il donne lieu à une libération d'électrons. Dans un premier temps, l'acétate est internalisé par la bactérie *via* l'acétate perméase. La molécule est ensuite intégrée dans le cycle sous forme d'acétyl-coenzyme A. Il s'opère alors une suite de réactions de réductions libérant des paires d'électrons à quatre reprises. Deux décarboxylations ont lieu lors des transformations de l'isocitrate en α -cétoglutarate et de l' α -cétoglutarate en succinyl-coenzyme A. Ces réactions

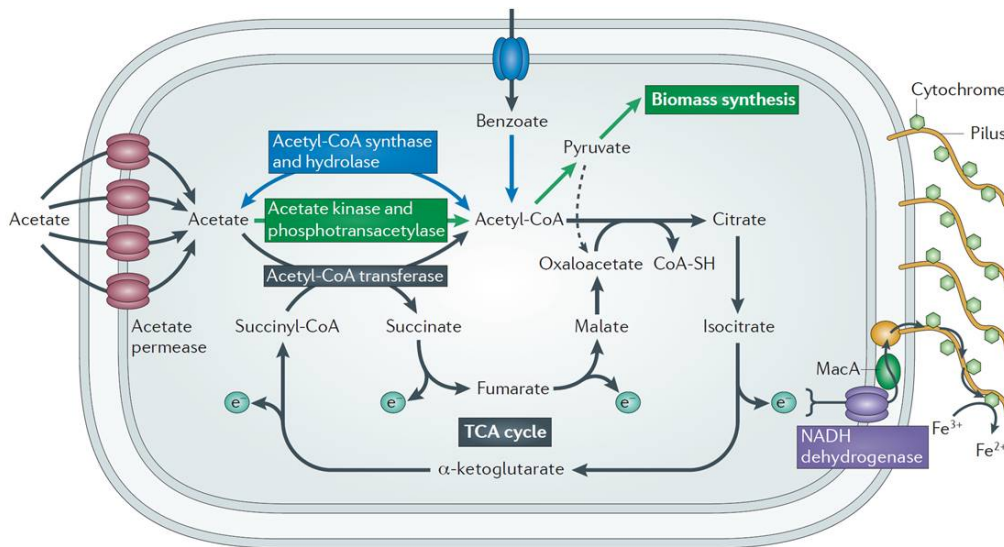


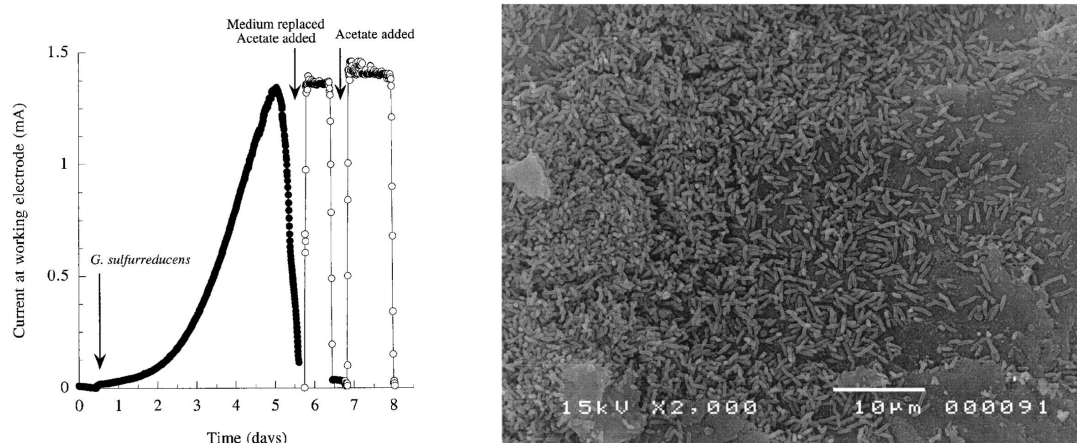
FIGURE I.3 – Voie métabolique de *G. sulfurreducens* permettant la conversion de l'acétate en électrons et en CO_2 . Note : Les décarboxylations entraînant la libération de CO_2 et les coenzymes réduites NADH et FADH_2 , porteuses des paires d'électrons, ne sont pas indiquées sur ce schéma [84].

libèrent des atomes de carbones sous forme de CO_2 . Le cycle de Krebs permet l'oxydation complète en CO_2 des deux atomes de carbone de l'acétyl, et la récupération de huit électrons portés par des coenzymes réduites, la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et la flavine adénine dinucléotide (FAD).

I.1.2.2 Exemple d'une demi-pile bactérienne : anode en carbone graphite/*Geobacter sulfurreducens*

En 2003, Bond and Lovley [16] publient le premier exemple d'utilisation de *Geobacter sulfurreducens* comme bactérie électroactive dans une pile à bactéries. On entend par électroactivité la capacité d'un organisme à transférer un électron généré par son métabolisme à un accepteur extérieur (solide ou en solution) [124]. À partir d'un substrat d'acétate ou de dihydrogène, les productions de courant obtenues par Bond and Lovley [16] sont les plus importantes de l'époque (jusqu'à $1,143 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$). Ces densités de courant sont 10 000 fois plus élevées que des résultats obtenus dans les mêmes conditions avec une autre bactérie électroactive, *Shewanella putrefaciens* [62]. De plus, ces performances semblent pouvoir être maintenues pendant plusieurs semaines contre quelques jours dans d'autres études [63].

La figure I.4(a) montre l'évolution du courant dans la demi-pile étudiée par Bond et Lovley [16]. *G. sulfurreducens* est mise en culture sous atmosphère anaérobie (N_2/CO_2 : 80/20), à 30°C avec $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acétate comme unique donneur d'électrons et $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fumarate comme unique accepteur d'électrons. La culture est ensuite inoculée dans une demi-pile contenant une électrode de graphite soumise à un potentiel de $0,2 \text{ V}$ par rapport à une électrode de référence $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$. À partir de l'introduction de *G. sulfurreducens* dans le milieu, ils observent une augmentation du courant mesuré par l'électrode de travail. Après 5 jours, le courant chute fortement pour retrouver son niveau de départ. En remplaçant le milieu



(a) Croissance et production de courant par *G. sulfurreducens*.

(b) Image MEB de l'adhésion de *G. sulfurreducens* sur l'électrode de carbone graphite.

FIGURE I.4 – Croissance et production de courant par *G. sulfurreducens* sur une électrode de carbone graphite sous potentiel (0,2 V par rapport à $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$)[16].

de culture par un tampon salin sans nutriments de croissance mais contenant de l'acétate ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), Bond et Lovley retrouvent immédiatement le courant mesuré avant la chute. Cette observation montre que le courant observé à l'électrode de travail provient uniquement des bactéries en contact direct avec l'électrode de graphite. Au bout d'un jour, le courant chute à nouveau. Une injection simple d'acétate (1 mmol.L^{-1}) dans la chambre de culture suffit alors à retrouver le courant de plateau. Les auteurs démontrent ici que l'acétate est, dans leur expérience, le substrat unique permettant l'électroactivité de *G. sulfurreducens*.

Dans cette même étude, Bond et Lovley notent que l'augmentation du courant est exponentielle avec un taux d'accroissement de $0,04 \text{ h}^{-1}$ et qu'elle dépend de la présence d'acétate dans le milieu. Cette observation laisse à penser que l'oxydation de l'acétate est un facteur nécessaire à la croissance de *G. sulfurreducens*. Notons enfin que les auteurs mettent en évidence l'absence de médiateurs solubles sécrétés par la bactérie dans la demi-pile. *G. sulfurreducens* ne semble donc pas utiliser ce mode de transfert pour externaliser ces électrons.

Les performances impressionnantes de *G. sulfurreducens* dans les piles à bactéries sont attribuées à deux phénomènes observés par Bond et Lovley. En effet l'oxydation complète de l'acétate en solution d'une part et l'adhésion des bactéries sur l'anode d'autre part, permettent la récupération quasi-totale des électrons disponibles (95 %). Le cliché MEB I.4(b) permet d'observer l'adhésion de *G. sulfurreducens* à l'électrode de graphite. Selon les auteurs, la compréhension de cette adhésion et l'amélioration de l'affinité bactérie/électrode sont des éléments essentiels au développement déjà prometteur des piles à bactéries.

I.1.2.3 Les interactions entre *G.sulfurreducens* et les électrodes

G. sulfurreducens est capable de transférer des électrons à des accepteurs solubles comme du citrate de fer ou insolubles comme des oxydes de fer. En présence en présence d'accepteurs insolubles, *G. sulfurreducens* synthétise des pilis, illustrés par la photo de la figure I.5[107].

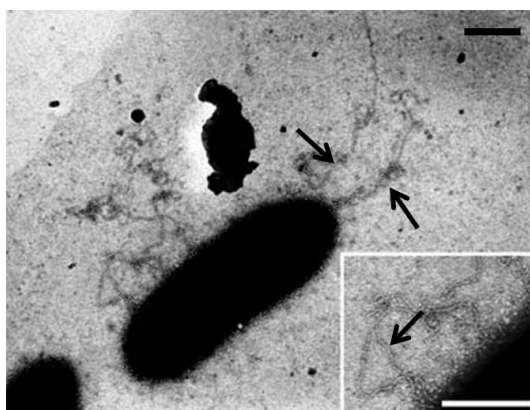


FIGURE I.5 – Cliché de *G. sulfurreducens* en présence d'oxyde de fer en microscopie électronique à transmission. Les flèches pointent les pilis. Échelles : $0,5 \mu\text{m}$ [107].

Dans le cas des piles bactériennes, l'accepteur d'électrons est une électrode solide. En 2006, Reguera et al. [108] comparent deux MFCs en utilisant *G. sulfurreducens* et une souche *G. sulfurreducens* génétiquement modifiée. Dans la première pile, ils inoculent *G. sulfurreducens*, et observent le courant émis ainsi que la morphologie du biofilm sur l'électrode. Le courant croît très vite. Sa valeur maximale est atteinte en 4 jours et l'ensemble des bactéries du biofilm semblent viables. Dans la seconde, un mutant de *G. sulfurreducens* ne fabricant pas de pili est inoculé. Le courant croît alors beaucoup moins vite. Sa valeur maximale est atteinte en 8 jours. Le biofilm est alors moins épais que dans la première MFC et 60 % des bactéries y sont mortes. Les auteurs notent que les bactéries vivantes se situent principalement à proximité de l'électrode. Cette étude montre que *G. sulfurreducens* peut transférer un électron par contact direct entre sa membrane et l'électrode *via* des cytochromes C. Cependant, ce sont les pilis qui vont permettre un transfert électronique massifs sur de longues distances (jusqu'à $20 \mu\text{m}$) à l'intérieur du biofilm.

I.2 Les axes de recherche dans le domaine des piles à bactéries

Malgré les progrès significatifs de ces quinze dernières années, les piles à bactéries ne sont pas encore assez performantes pour alimenter durablement des dispositifs électriques. De nombreux axes de recherche sont donc apparus pour tenter d'améliorer la compréhension de ces piles et avec elles leurs performances.

Ces axes visent principalement à améliorer des points clés du fonctionnement des piles à bactéries :

- Le transport des électrons dans l'électrode en améliorant la conductivité de celle-ci.
- La surface de contact entre les bactéries et l'électrode.
- La survie des micro-organismes, et donc le temps de vie de la pile à bactéries.
- Les performances des micro-organismes, en sélectionnant de nouveaux mutants ou en utilisant plusieurs espèces en collaboration.

La suite de ce chapitre expose les moyens mis en œuvre pour améliorer ces différents points clés.

I.2.1 Des électrodes innovantes

L'interaction entre l'anode et la bactérie est un facteur primordial dans le transfert électronique. L'affinité de *G. sulfurreducens* pour le graphite a poussé la communauté scientifique vers l'utilisation de matériaux carbonés aux architectures variées comme des maillages ou des feutres de carbone [138]. D'autres matériaux ont été testés avec succès comme l'or [111] ou l'acier inoxydable [33].

Un des facteurs les plus importants dans les performances d'une pile bactérienne est la surface spécifique de l'électrode [77]. Cette surface spécifique doit être considérée à l'échelle de la bactérie, c'est à dire le micromètre. Pour être performante, une électrode doit permettre une adhésion maximale des bactéries et favoriser la formation d'un biofilm sur l'ensemble de sa surface spécifique. Selon Palmer et al. [96], l'adhésion de bactéries sur une surface est guidée par les transports de masse jusqu'à cette surface et les propriétés chimiques de celle-ci comme sa charge électrique et son énergie de surface. De plus une rugosité de surface de l'ordre de la taille de la bactérie favorise la formation de biofilms dans la mesure où elle entraîne la capture et l'adhésion de bactéries dans des volumes morts de la surface [39]. Les matériaux privilégiés pour les électrodes de MFC sont donc ceux présentant une grande conductivité favorisant le transfert d'électrons, une macroporosité permettant la diffusion des bactéries au sein de l'électrode et des propriétés de surface facilitant leur adhésion. Ils doivent également être biocompatibles et stables dans le temps.

Des matériaux comme les mousses d'acier inoxydable présentent ces caractéristiques et permettent l'obtention des performances supérieures au graphite dans les MFC [61]. Il est également possible de fabriquer des matériaux d'électrode à partir de mélanges polymère/nanotubes de carbone. Higgins et al. [50] exposent un procédé permettant de créer un matériau conducteur avec une double porosité de l'ordre de 12 et 100 μm . Les auteurs dispersent des nanotubes de carbones (CNT) dans une matrice de chitosan. L'ensemble est ensuite réticulé puis gelé à -20°C . La chute de température fait alors apparaître une structure poreuse illustrée par la figure I.6(a) issue de travaux de la même équipe [67]. Ce matériau présente alors une porosité permettant la colonisation totale de la structure 3D par une bactérie électroactive. L'état de surface permet l'adhésion des bactéries et la conductivité de la structure assure les transferts électroniques.

Des matériaux conducteurs poreux peuvent être obtenus par d'autres stratégies. Par exemple, Xie et al. [142] recouvrent de CNT un tissu de fibres de polyester (20 μm de diamètre). Ils obtiennent ainsi une structure conductrice (1250 S.cm^{-1}), qui présente une surface d'échange entre le biofilm et l'électrode 10 fois plus grande que la surface projetée du tissu. Les auteurs notent également que les CNT confèrent à l'électrode une bonne interaction avec le biofilm et facilitent le transfert électronique entre les bactéries et l'anode.

Les progrès du domaine des électrodes ont amené des équipes de recherche à repenser la morphologie globale de la chambre anodique. En 2005, Rabaey et al. [106] utilisent une

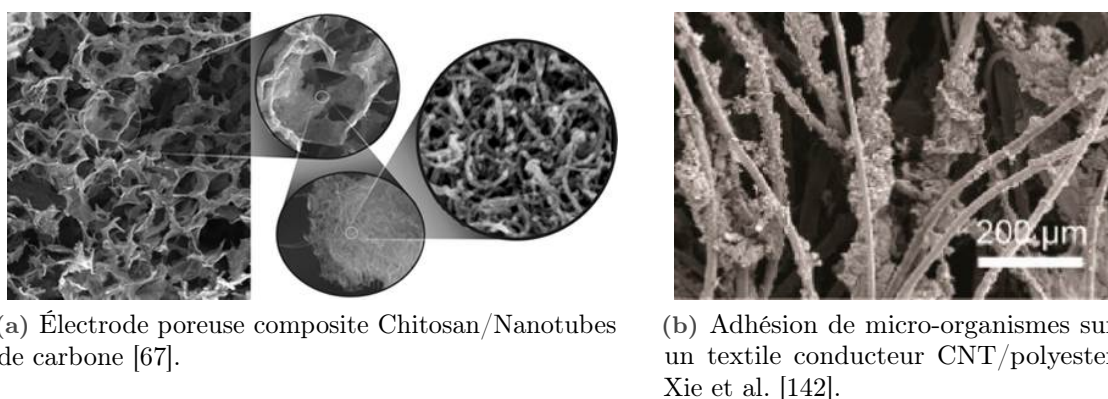


FIGURE I.6 – Structure d'électrodes poreuses utilisées comme anode dans les piles bactériennes

anode en graphite granulaire disposée dans une chambre tubulaire. Cette chambre anodique peut être traversée par de l'anolyte en flux continu. La pile n'est donc jamais limitée par le substrat. Ces anodes dites en "flux continu" sont largement utilisées aujourd'hui. Elles permettent la modification aisée de la composition de l'anolyte et l'obtention de densités de courant supérieures aux chambres anodiques conventionnelles [22, 54].

I.2.2 Étude des interactions entre espèces

L'application principale des piles bactériennes est la production d'énergie à partir d'eaux usées. Pour ces applications concrètes, c'est une communauté bactérienne électroactive qui est utilisée pour dégrader les déchets jusqu'à la restitution d'électrons à une électrode [73]. Dans ces mélanges, les bactéries sont en "collaboration". Elles assimilent des molécules présentes dans le milieu originel mais également des substrats sécrétés par d'autres espèces de la coculture. En bout de chaînes, une ou plusieurs espèces transfèrent des électrons à une électrode solide et génèrent du courant. Ces consortiums sont constitués de micro-organismes capables de dégrader des macromolécules en produit de fermentation, et de micro-organismes utilisant ces produits pour une transformation électroactive. Une meilleure connaissance de ces cocultures est nécessaire. En effet, elle permettrait de créer volontairement des collaborations bactériennes afin d'optimiser les transferts de substrats ou d'électrons entre les espèces et améliorer ainsi les performances des piles bactériennes dans des applications concrètes.

En collaboration, des bactéries vont pouvoir s'échanger des électrons par deux voies distinctes. La première est chimique et utilise une molécule oxydo-réductrice comme médiateur. Une molécule sécrétée par une bactérie peut être métabolisée par une autre pour donner un nouveau produit de fermentation. Ce mécanisme se répétant plusieurs fois constitue une chaîne trophique conduisant à un accepteur d'électron final, soluble comme le fumarate, ou insoluble comme une électrode. En 2007, Ren et al. [110] montrent qu'il est possible de convertir de la cellulose en électricité. Aucun micro-organisme connu est capable à la fois de métaboliser la cellulose et de transférer des électrons à un substrat solide. Cette conversion est rendue possible par la collaboration de deux micro-organismes dans la chambre anodique d'une

Chapitre I. L'essor des biotechnologies dans le domaine des piles bactériennes

Bactéries (Substrat)	<i>Geobacter</i> (acétate)	<i>Clostridium</i> (CMC)	Coculture (CMC)	Coculture (CN)	MNB (CMC)	MNB (CN)
Dégradation cellulose %	-	42.5	64	49	41	40
Rendement %	51	0	47	39	27	22

Tableau I.1 – Comparaison de piles à bactéries utilisant *Geobacter* et/ou *Clostridium* ou un mélange naturel bactérien issu d'une boue (MNB). Les substrats utilisés sont l'acétate, la carboxyméthylcellulose de synthèse (CMC) ou la cellulose naturelle (CN) [110]. Le rendement correspond au courant total réellement obtenu divisé par le courant théorique pouvant être issu de la cellulose.

MFC : *Clostridium cellulolyticum* et *G. sulfurreducens*. En métabolisant de la cellulose, *C. cellulolyticum* relargue trois produits de fermentation : l'acétate, l'éthanol et l'hydrogène. Ces molécules sont ensuite oxydées par *G. sulfurreducens*. Les électrons issus de l'oxydation sont transférés par la bactérie à l'anode. Idéale dans la théorie, cette coculture se révèle également très efficace en pratique. Dans les mêmes conditions opérationnelles, la pile utilisant la coculture de *C. cellulolyticum* et *G. sulfurreducens* affiche un rendement deux fois plus élevé qu'une MFC conventionnelle utilisant un mélange naturel de bactéries issues d'une boue (tableau I.1).

En regard de ces transferts chimiques, Summers et al. [123] montrent qu'une coculture de bactéries anaérobies peut également échanger des électrons par transfert direct. Pour métaboliser de l'éthanol, *G. metallireducens* et *G. sulfurreducens* sont mis en coculture en présence de fumarate comme accepteur final d'électron. *G. metallireducens* oxyde l'éthanol en acétate en transférant des électrons à *G. sulfurreducens*, permettant sa croissance. Pour croître, *G. sulfurreducens* peut également utiliser l'oxydation de l'acétate produit par *G. metallireducens*. Dans leur étude, Summers et al. [123] montrent que les bactéries se rassemblent sous forme d'agrégats conducteurs. Dans ces agrégats, les électrons sont transférés de manière directe à l'aide de cytochromes et de pilis. Shrestha et al. [119] démontrent par la suite que le transfert électronique direct est suffisant pour permettre la croissance des deux micro-organismes en milieu anaérobie.

I.2.3 Sélection de nouveaux micro-organismes électroactifs

Les espèces électroactives connues aujourd'hui proviennent de mélanges bactériens prélevés dans la nature. Les espèces présentes sur les électrodes de MFC ont pu être identifiées [79]. Des extraits bactériens issus de déchets et utilisés dans les MFC sont analysés par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant. Cette technique sépare des molécules d'ARN par migration au sein du gel. Un séquençage des ARN principaux permet d'identifier des séquences propres à certains groupes de bactéries. On obtient alors des informations générales sur les espèces composant le mélange bactérien. Cette technique ne permet pas l'identification complète des bactéries, et ne sépare pas les micro-organismes suivant leur électroactivité.

En parallèle de cette démarche globale, il est possible d'adopter une approche plus spécifique pour isoler des bactéries électroactives. Hou et al. [52] proposent un dispositif de 24 piles microbiennes permettant l'étude de 24 souches bactériennes dans des conditions strictement similaires. En partant d'un échantillon naturel, Hou et al. [52] pré-sélectionne des bactéries

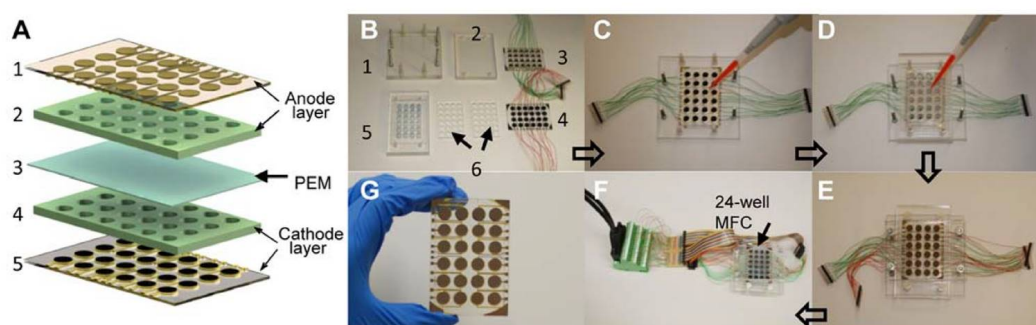


FIGURE I.7 – Illustration et étapes de montage de la plateforme de criblage pour bactéries électroactives composée de 24 piles bactériennes en parallèles [52]

électroactives potentielles. La pré-sélection consiste en la culture sur boîte d'agar de bactéries en présence d'un agent se décolorant lorsqu'il est réduit. Les colonies décolorant le gel environnant présentent des capacités de réduction et sont pré-sélectionnées pour la suite de l'étude. Les espèces isolées sont ensuite inoculées dans des MFC en parallèles (figure I.7). Le suivi de la production de courant permet alors de détecter la souche la plus efficace. Les auteurs isolent ainsi une souche de la famille de *Shewanella* parmi plus de 1200 bactéries présentes dans l'échantillon naturel. Cette souche est 2,6 fois plus puissante que *Shewanella oneidensis* utilisée comme référence. Cette étude ouvre la voie du criblage d'espèces électroactives.

Une dernière approche consiste à cultiver une espèce électroactive dans des conditions particulières pour isoler un variant de l'espèce plus performant. En 2009, Yi et al. [143] ont mis en culture la souche sauvage de *G. sulfurreducens* pendant 5 mois. Ils prélèvent ensuite le biofilm formé et isolent sur boîte d'agar les bactéries présentes. En testant les bactéries isolés, les auteurs découvrent une souche variante de *G. sulfurreducens* (nommée KN4000). Cette nouvelle souche plus performante permet d'atteindre des densités de courant 7 fois plus élevées que la souche sauvage. Cette efficacité augmentée est notamment expliquée par une plus grande densité de pilis à la surface de KN4000.

I.2.4 "Going small", les avantages des biopiles de taille milli et micrométrique

À leur découverte, les piles bactériennes étaient constituées de chambres anodiques et cathodiques de volume important, pouvant aller jusqu'à plusieurs litres (figure I.1). Les études récentes ont tendance à s'orienter vers des piles de plus petits volumes de l'ordre du millilitre (milliMFC) voir du microlitre (microMFC) (figure I.8). La diminution du volume des MFC permet notamment de diminuer la résistance interne entre les chambres anodique et cathodique. Cette diminution engendre également une augmentation du rapport de la surface d'électrode sur le volume de la chambre anodique. Ces phénomènes confèrent aux milliMFC et aux microMFC une densité de puissance augmentée par rapport aux MFC classiques. À ces échelles, les systèmes présentent une meilleure sensibilité de mesure pouvant descendre jusqu'au nano-ampère pour les microMFC [28]. La précision de mesure permet donc une étude plus

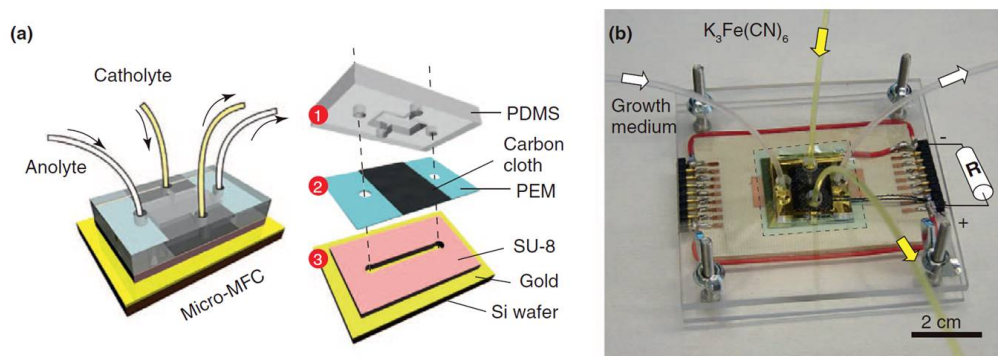


FIGURE I.8 – Exemple d'une micro-pile bactérienne ($1,5 \mu\text{L}$) réalisée par microfabrication [104].

fine et rapide des interactions bactéries/électrode. Le challenge principal des microMFC est de permettre l'étude de bactéries uniques. Elles offriraient alors un point de vue nouveau sur la compréhension des processus biochimiques et électrochimiques à l'interface bactérie/électrode. Elles permettraient également d'étudier la variabilité phénotypique de populations de bactéries électroactives.

Les piles bactériennes de taille milli et micrométrique à cause de leur encombrement faible et leur faible consommation en matériaux et milieux permettent d'envisager une parallélisation des MFC. Cette parallélisation ouvre la voie de la sélection de micro-organismes. Comme évoqué dans le paragraphe précédent, il est possible de paralléliser des biopiles pour sélectionner les bactéries les plus performantes dans la conversion de matière organique en courant électrique. La parallélisation est également applicable à l'échelle millimétrique et micrométrique. Par exemple, Mukherjee et al. [89] a utilisé une approche similaire aux travaux de Hou et al. [52] en développant une plateforme de parallélisation avec des piles bactériennes micrométriques ($1,5 \mu\text{L}$).

I.2.5 Vers un nouvel outil de sélection de micro-organismes électroactifs

Étant donné leur encombrement et leur coût, il apparaît évident que les piles microbiennes conventionnelles ne sont pas adaptées à la parallélisation et à la sélection de nouveaux micro-organismes électroactifs. La millifluidique et la microfluidique ouvrent des voies vers la miniaturisation des systèmes et la réduction des coûts de fabrication (diminution des volumes de réactifs, diminution des surfaces d'électrodes). Dans la littérature, les études proposant une parallélisation des systèmes pour de la sélection d'organismes électroactifs sont rares.

L'objectif premier de cette thèse est de réaliser un outil de sélection pour explorer la biodiversité et sélectionner des micro-organismes électroactifs performants. Un outil de sélection de micro-organismes se doit de comporter certaines caractéristiques primordiales. Il doit entre autres :

- être facilement parallélisable pour comparer de manière simple les micro-organismes entre eux ;
- être adapté aux critères de sélection choisis ;

I.3. La capsule à cœur liquide : un outil original pour l'étude de micro-organismes

— permettre d'isoler et de récupérer les micro-organismes sélectionnés.

À partir de ce cahier des charges, il est possible de schématiser un tel outil (figure I.9). Il est composé de réservoirs parallélisables contenant les bactéries à étudier. Afin de ne pas être limité par le substrat, le réservoir devra permettre la diffusion du milieu de culture en son cœur. Pour sonder l'électroactivité des populations isolées, chaque réservoir doit pouvoir être connecté électriquement. Enfin le réservoir doit être conçu pour permettre une récupération facilitée des bactéries qu'il contient.

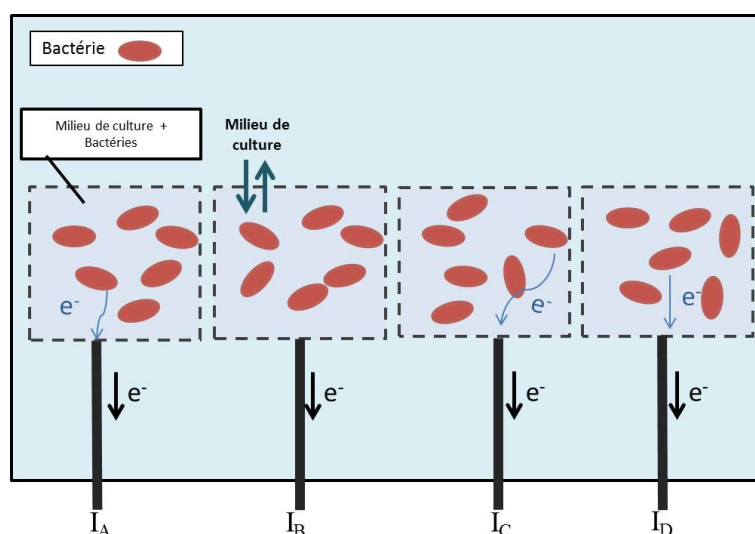


FIGURE I.9 – Schéma d'un outil de sélection adapté à la culture et au criblage de bactéries électroactives suivant leur performances en production de courant.

Dans la suite de ce chapitre introductif, nous présentons la capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel. Cet objet réalisé par une technique millifluidique représente le point de départ de l'outil de culture et de sélection développé durant cette thèse.

I.3 La capsule à cœur liquide : un outil original pour l'étude de micro-organismes

I.3.1 Un outil à l'échelle millifluidique

Aujourd'hui, la miniaturisation des piles bactériennes repose sur la diminution des volumes des chambres anodiques et cathodiques. Ces MFC comportent alors des réservoirs monophasiques confinés dans une enceinte solide.

La microfluidique en gouttes permet la création en série de micro-réservoirs liquides dans une matrice liquide [132]. Dans ces systèmes bi-phasiques, il est possible d'isoler et cultiver en parallèle des organismes biologiques individualisés [14] [87]. Ces cultures compartimentées peuvent ensuite être déplacées, modifiées et étudiées [24].

Cependant, à cette échelle, la réduction des volumes entraîne généralement une diminution de la quantité de nutriments et donc un développement moindre des organismes isolés. Un système perfusé peut résoudre cette limitation, mais le volume des réservoirs impose une nouvelle limite à la taille de la population étudiée. Le comportement observé à l'échelle du micromètre peut alors être différent de celui observé dans des volumes macroscopiques. Dans les MFCs, les effets collectifs comme la formation de biofilms sont importants et doivent être pris en compte dans une optique de sélection de micro-organismes performants. L'outil que nous souhaitons réaliser doit donc permettre le développement et l'étude de populations importantes afin de s'approcher au mieux de conditions rencontrées dans des applications macroscopiques. Nous nous sommes donc tournés vers la millifluidique.

La millifluidique permet, elle aussi, la culture compartimentée et parallélisée de micro-organismes. Comme en microfluidique, il est possible de créer en série des réservoirs dans une phase porteuse non miscible. Au Laboratoire de Colloïdes et Matériaux Divisés, un outil de millifluidique digitale permet d'isoler jusqu'à une bactérie par réservoir [7]. La croissance de ces cultures monoclonales est suivie par des mesures d'absorbance automatisées. Cet outil autorise l'analyse en parallèle de plus de mille bioréacteurs. Son utilisation récente a notamment permis d'explorer la diversité phénotypique d'une population d'*Escherichia coli* [26].

Cette technologie nécessite le confinement des bioréacteurs dans un canal. Mais il est également possible de créer des compartiments de taille millimétriques sans confinement. Le laboratoire a développé une nouvelle technique de fabrication de capsules millimétriques de structure cœur-coque. Ces objets biocompatibles sont présentés dans la suite de ce chapitre. Ils permettent notamment l'encapsulation de cellules vivantes tels que des cellules mammifères, des bactéries, ou encore des algues unicellulaires.

I.3.2 La capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel

Les capsules à cœur liquide et membrane d'hydrogel ont été développées par Bremond et al. [18] et étudiées de façon plus approfondie par Leslie Rolland durant ses travaux de thèse [113]. Nous décrivons ici le procédé de fabrication de ces capsules ainsi que leurs propriétés physico-chimiques.

I.3.2.1 Fabrication de la capsule à cœur liquide

Le procédé de fabrication des capsules à cœur liquide et à membrane d'hydrogel est exposé sur la figure I.10.

Il est initié par la création d'une bigoutte à l'aide de deux tubes coaxiaux. Cette bigoutte est composée d'un fluide de cœur, correspondant à la solution que l'on veut encapsuler, et un fluide de coque qui composera la membrane de la future capsule. Le fluide de coque est une solution d'alginate de sodium. L'alginate est un polysaccharide hydrosoluble biocompatible qui gélifie en présence d'ions divalents. Ses caractéristiques seront développées dans le chapitre suivant. La bigoutte se détache de l'injecteur et chute dans un bain de chlorure de calcium. Les ions Ca^{2+} sont alors complexés par l'alginate, et le fluide de coque devient un gel. La membrane d'hydrogel se forme et encapsule le cœur de la bigoutte.

I.3. La capsule à cœur liquide : un outil original pour l'étude de micro-organismes

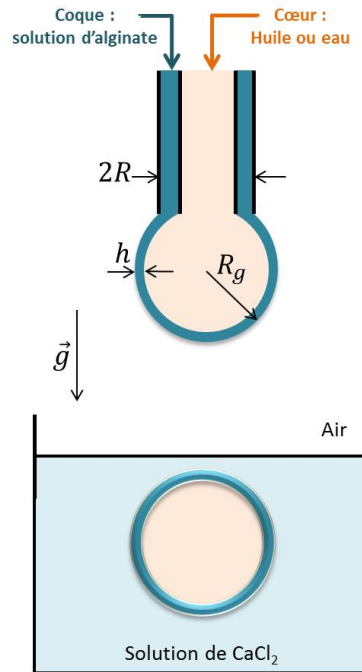


FIGURE I.10 – Schéma représentant le procédé de fabrication d'une capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel d'alginate. Une bigoutte est formée par coextrusion. Une fois détachée, la bigoutte chute dans un bain de calcium qui entraîne la gélification de la solution d'alginate.

La fabrication des capsules est réalisée en régime goutte à goutte en contrôlant les débits des solutions de cœur et de coque par des pousse-seringues. Il est donc possible de faire varier ces débits pour moduler l'épaisseur de la membrane d'hydrogel.

Si l'on note le Q_i le débit du fluide de cœur et Q_e le débit du fluide de coque, l'épaisseur de la couche d'alginate h s'exprime en fonction de $R_q = Q_i/Q_e$ le rapport des débits et R_g le rayon de la bigoutte comme suit :

$$h = R_g \left(1 - \left(\frac{R_q}{1 + R_q} \right)^{\frac{1}{3}} \right)$$

Dans les conditions expérimentales de la thèse de Leslie Rolland (le rayon de l'injecteur, $R = 1$ mm), le rayon de la bigoutte est égal à 1,7 mm. Le ratio des débits R_q peut être choisi entre 1 et 12 pour obtenir des couches d'alginate variant entre $360 \mu\text{m}$ et $45 \mu\text{m}$. Cette technique d'encapsulation permet donc d'obtenir des épaisseurs de membrane comprises entre 3 % et 20 % du rayon total de la capsule. Notons que les épaisseurs h données ici sont des épaisseurs moyennes. Comme le montre la figure I.11, les capsules ont une forme de sphéroïdes, et l'épaisseur de la membrane est inhomogène. Elle est plus grande au niveau du point de détachement de la bigoutte.

Dans leurs travaux, Bremond et al. [18] montrent qu'il n'est pas possible d'encapsuler un cœur aqueux par une simple solution d'alginate avec des R_q élevés ($R_q > 1$). Dans le cas d'un cœur aqueux, les deux fluides composant la bigoutte sont miscibles. Lors de l'impact dans le bain de calcium, la bigoutte est soumise à des contraintes importantes et les fluides interne et

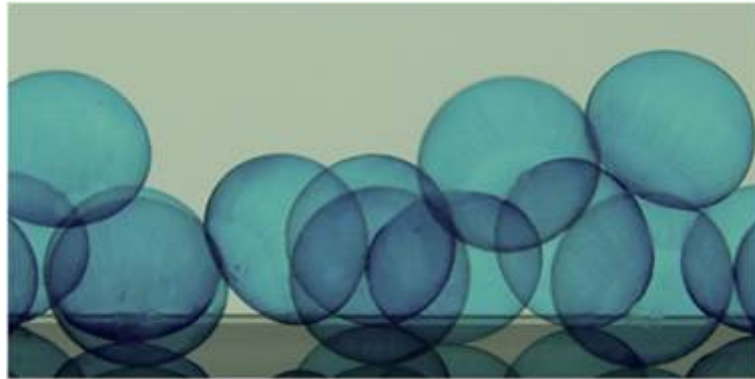


FIGURE I.11 – Photo de capsules à cœur liquide aqueux et membrane d’alginate à 2 % en masse et de $100\ \mu\text{m}$ d’épaisseur. Pour une meilleure visualisation, l’hydrogel d’alginate a été colorée avec du bleu alcian [114].

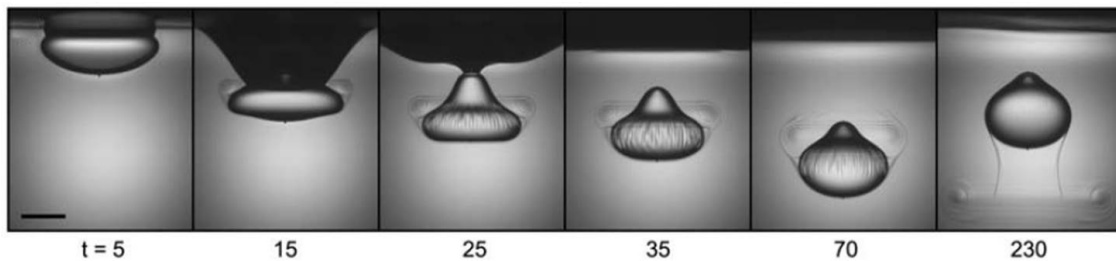


FIGURE I.12 – Pénétration et gélification d’une bi-goutte dans un bain de CaCl_2 . Les temps sont indiqués en millisecondes. Échelle : 2 mm [18].

externe se mélangent. Pour éviter ce phénomène, Bremond et al. [18] ajoutent dans la solution d’alginate un tensioactif anionique, le sodium dodécylsulfate (SDS). Le SDS, non soluble dans le calcium, précipite lors de l’impact de la goutte dans le bain, et stabilise ainsi l’interface goutte/bain pendant la gélification de l’alginate. Pour obtenir des membranes fines ($\sim 45 - 100\ \mu\text{m}$), la concentration en SDS doit être de l’ordre de $5\ \text{mmol.L}^{-1}$. Pour améliorer le mouillage de la bigoutte avec le bain de gélification, il est nécessaire d’ajouter une faible quantité de tensioactif dans le bain. Par exemple, Bremond et al. [18] ajoutent 0,1 % en masse de Tween 20 dans la solution de chlorure de calcium.

Les photos de la figure I.12 illustrent la pénétration de la capsule dans le bain de gélification lors de l’utilisation du SDS et du Tween. Les interfaces sont stabilisées.

Après la pénétration de la bigoutte dans le bain, le calcium diffuse dans la couche extérieure et entraîne la gélification de l’alginate. Il est possible d’estimer le temps nécessaire à la gélification de la membrane. Avec une membrane de $200\ \mu\text{m}$ d’épaisseur, connaissant le coefficient de diffusion du calcium dans l’alginate, $D = 7.10^{-4}\ \text{mm}^2.\text{s}^{-1}$ [102], on obtient :

$$t^2 \sim \frac{h^2}{D} \simeq 1\ \text{min}$$

On peut donc considérer qu’une minute suffit à la gélification totale de l’alginate et donc à la création de la capsule

I.3. La capsule à cœur liquide : un outil original pour l'étude de micro-organismes

Remarque : Dans la suite de ce manuscrit, les valeurs données en pourcentage correspondent au pourcentage en masse sauf mention contraire.

I.3.2.2 Un outil adapté à la culture cellulaire

Le processus d'encapsulation a trouvé récemment de nombreuses applications dans le domaine de la biologie. Différents types de capsules ou de billes ont déjà été utilisées comme bioréacteurs pour la culture de cellules [97, 131]. L'encapsulation de cellules uniques permet le développement et l'étude de colonies monoclonales [136]. Généralement, les méthodes d'encapsulation sont largement parallélisables et ouvrent la voie vers le tri cellulaire et la détection de substances actives [68]. Enfin, la culture en capsule offre aux organismes isolés comme des cellules mammifères ou des tissus, un environnement tri-dimensionnel se rapprochant des conditions de culture *in vivo*. De telles conditions ne peuvent être remplies par des méthodes de culture conventionnelles comme les boîtes de pétri ou les plaques multi-puits.

La capsule à cœur liquide développée au LCMD est un outil adapté à la culture de micro-organismes.

En utilisant une concentration adaptée en micro-organismes dans le fluide de cœur, il est possible d'injecter une unique cellule par goutte. Une fois formée, la capsule peut être placée dans le milieu de culture de l'organisme encapsulé.

La membrane d'hydrogel est semi-perméable. En mesurant la fuite de macromolécules, Leslie Rolland a estimé la taille des pores de ce gel à 20 nm [113]. Cette taille permet aux nutriments et à l'oxygène de diffuser vers l'intérieur de la capsule pour contribuer au développement et à la division de la cellule encapsulée. La semi-perméabilité de la membrane autorise uniquement les échanges d'objets de taille inférieure à sa taille de coupure. Schématisée dans la figure I.13(a), la culture en capsule permet donc d'isoler physiquement la culture du milieu extérieur, en conservant un lien chimique avec celui-ci.

La membrane d'alginate est une membrane solide présentant des propriétés viscoélastiques aux faibles déformations puis plastiques au delà d'une déformation critique [114]. La capsule peut donc être manipulée manuellement, compressée légèrement ou encore agitée sans être endommagée.

La structure de la membrane d'hydrogel est due aux points de réticulation du réseau physique créés par les cations divalents. De manière surprenante, si une capsule est plongée dans un grand réservoir d'eau ultrapure, elle garde son intégrité. Ce phénomène indique la complexation forte entre les cations divalents et les chaînes d'alginate. Cependant Rolland et al. [114] montrent que si l'on ajoute un cation monovalent dans la solution baignant la capsule, celui-ci déstabilise le gel et détruit la membrane. Ce phénomène est important à prendre en compte dans le cas d'applications en biologie où les capsules sont utilisées dans des milieux à forte ionocité. Pour contrer cette déstabilisation, il est nécessaire de garder une faible concentration de cations divalents ($\sim 1 \text{ mmol.L}^{-1}$) dans la solution baignant la capsule. L'hydrogel physique est alors stable dans le temps dans les milieux biologiques.

Enfin, la fabrication au goutte à goutte permet la parallélisation des cultures en créant des bioréacteurs avec une fréquence de l'ordre du hertz.

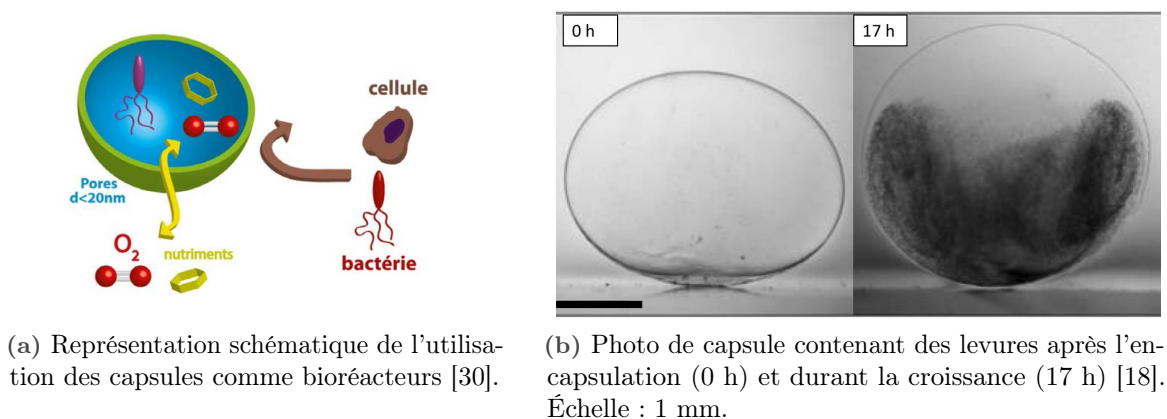


FIGURE I.13 – La culture de cellules et micro-organismes en capsules

Aujourd'hui, ces capsules cœur-coque ont déjà été utilisées pour la culture de cellules. Les propriétés physico-chimiques de la membrane d'hydrogel confèrent à la capsule une résistance aux contraintes mécaniques et permettent l'agitation des cultures. Bremond et al. [18] montrent qu'il est possible de cultiver des levures pendant plusieurs jours (figure I.13(b)). Actuellement cette technique d'encapsulation est utilisée au laboratoire pour étudier différents types de cellules (fibroblastes, cellules souches, cellules tumorales...) ou de micro-organismes (bactéries, algues unicellulaires...) [2].

I.3.3 Vers une capsule à membrane conductrice

Les capsules à cœur liquide et à membrane d'hydrogel présentent les caractéristiques requises pour la création d'un outil de sélection. Comme défini dans notre cahier des charges, la culture en capsule est parallélisable et permet de compartimenter les organismes cultivés. La manipulation aisée des capsules facilite la récupération des micro-organismes après sélection.

Nous souhaitons sélectionner des micro-organismes suivant leur capacité à convertir de la matière organique en courant électrique, en transférant des électrons à une électrode solide. Il est donc nécessaire de modifier les propriétés de la capsule pour adapter celle-ci à la sélection de bactéries électroactives. Pour cela, nous avons choisi d'ajouter à la membrane la propriété de conduction électrique. Connectée électriquement, elle pourrait se comporter comme une électrode. Les bactéries encapsulées, en contact physique avec la membrane, utiliseraient alors celle-ci pour transférer leur électrons hors de la capsule. La figure I.14 représente schématiquement une telle capsule à membrane conductrice semi-perméable.

I.4 Objectifs

Dans ce chapitre introductif, nous avons vu que les piles à bactéries représentent une voie de valorisation des déchets organiques. Elles reposent sur la conversion de la matière organique en courant électrique *via* l'activité métabolique de bactéries dites électroactives. Ces bactéries sont capables de transférer des électrons issus de leur métabolisme à une électrode

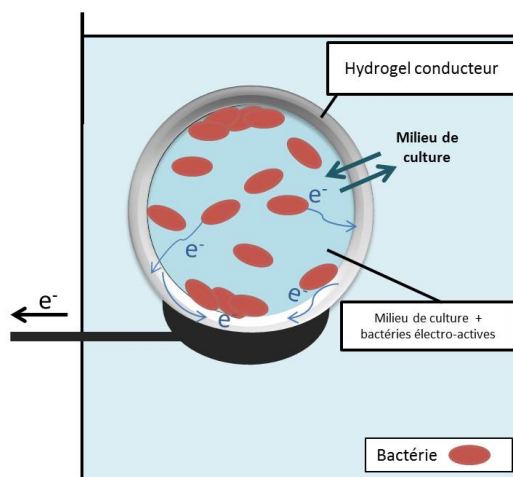


FIGURE I.14 – Schéma de principe d'une capsule à membrane conductrice et semi-perméable permettant la culture de bactéries électroactives. Par connexion extérieure, il est possible de sonder l'activité électrique de la population encapsulée.

solide. Des nombreux travaux ont permis le développement de piles bactériennes de plus en plus performantes. La création d'électrodes innovantes et une meilleure compréhension des métabolismes bactériens permettent aujourd'hui d'envisager les piles bactériennes comme une alternative énergétique. Cependant leur puissance et leur durée de vie ne sont pas encore suffisantes pour permettre l'alimentation de dispositifs électriques conventionnels.

La découverte de *G. sulfurreducens* et son utilisation dans une pile bactérienne constitue une des plus grandes avancées du domaine des piles à bactéries. L'immense diversité des micro-organismes, nous invite à penser qu'il existe des bactéries électroactives encore plus performantes. Cependant les techniques conventionnelles ne peuvent étudier cette diversité.

Dans le but d'explorer la biodiversité, il est donc nécessaire de développer un nouvel outil permettant d'isoler, cultiver, tester, et finalement sélectionner des bactéries suivant leur électroactivité. Les capsules à cœur liquide et membrane d'hydrogel semi-perméable développées utilisées au LCMD constituent un point de départ cohérent pour la réalisation de cet outil. Ces capsules permettent l'échantillonnage et la culture parallélisée de cellules et de micro-organismes. Il convient à présent d'adapter cet objet à la culture et la sélection de bactéries électroactives. Pour cela, il est nécessaire de conférer à la membrane une nouvelle propriété de conduction électrique. Une fois réalisée, cette membrane conductrice pourra être connectée électriquement pour nous permettre de sonder l'activité électrique de la population bactérienne encapsulée et sélectionner ainsi la plus performante.

Un des challenges majeurs de ces travaux de thèse est donc de formuler un hydrogel satisfaisant toutes les contraintes imposées par notre système. Cet hydrogel doit évidemment être biocompatible et conducteur, mais il faut également que sa formulation permettent la création de capsules à cœur liquide selon le procédé développé par le laboratoire. La formulation et la caractérisation d'un tel hydrogel sont les objets du chapitre suivant.

Chapitre II

Un hydrogel composite conducteur : formulation et propriétés

Sommaire

II.1 Un double réseau d'hydrogel et de charges dispersées	30
II.1.1 Généralités sur les hydrogels	30
II.1.2 Les hydrogels conducteurs	31
II.1.3 Stabilité colloïdale de dispersions de particules solides	32
II.1.4 Choix des matériaux	35
II.2 Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel	40
II.2.1 La dispersion des nanotubes par ultrasonication en présence de ten- sioactif	40
II.2.2 Étude de l'adsorption des tensioactifs étudiée par tensiométrie	42
II.2.3 Les mélanges Alginate/Nanotubes de carbone	47
II.2.4 Protocole complet de fabrication de billes Alginate/MWNT	51
II.3 Caractérisation de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par impé- dancemétrie	53
II.3.1 Mesure de conductivité par impédancemétrie	53
II.3.2 Mesures brutes d'impédancemétrie	53
II.3.3 Influence du fond ionique sur l'impédance de l'hydrogel	54
II.3.4 Modèle équivalent du système Alginate/MWNT/fond ionique.	55
II.3.5 Approximation des courbes réelles par le modèle théorique	57
II.3.6 Conductivité des autres hydrogels Alginate/MWNT-Brij	60
II.3.7 Conclusion sur la mesure d'impédance	61
II.4 Conclusion	61

II.1 Un double réseau d'hydrogel et de charges dispersées

II.1.1 Généralités sur les hydrogels

Un hydrogel est un réseau tri-dimensionnel capable d'absorber jusqu'à un millier de fois sa masse sèche en eau. Il existe deux grandes classes d'hydrogels. On parle d'hydrogels "permanents" ou "chimiques" lorsque le réseau est réticulé de manière permanente par des liaisons covalentes. Ce réseau peut être synthétisé entre autres par copolymérisation [140] ou par réticulation de polymères hydrosolubles. Les hydrogels sont dits "réversibles" ou "physiques" lorsque que le réseau est formé par l'enchevêtrement moléculaire et des forces de nature ionique, hydrophobe ou de type liaisons hydrogène. Dans les hydrogels, les points de réticulations sont parfois mal répartis et peuvent créer des inhomogénéités [51]. Le champ de formulation des hydrogels est vaste et permet d'ajuster finement leurs propriétés. Les propriétés communes à la plus part de hydrogels sont exposées ici :

Un matériau poreux

Composés en majorité d'eau, les hydrogels possèdent un volume libre grand par rapport à leur volume total. Le volume libre permet en général la définition d'une porosité de gel, correspondant à la taille des pores (R_{spore}) du réseau. Cette porosité permet la diffusion de solutés à travers l'hydrogel. Suivant la taille du soluté (R_s), la diffusion peut être libre pour $R_s \ll R_{\text{pore}}$, limitée pour $R_s \sim R_{\text{pore}}$ ou bloquée pour $R_s \gg R_{\text{pore}}$. La porosité d'un hydrogel peut être modulée par les facteurs suivants : le degré de réticulation, la structure chimique du polymère et des stimuli externes comme la température, le pH ou encore la force ionique [70]. Lors de la formulation, la taille des pores est généralement adaptée à l'application de l'hydrogel. Par exemple, la taille des pores d'un hydrogel biomédical est typiquement comprise entre 5 nm et 100 nm [29, 86]. Cette taille permet la diffusion libre de molécules organiques et ralentit la diffusion de molécules plus grandes comme les protéines ou les peptides [51].

Des propriétés mécaniques ajustables

En fonction de son application, les propriétés mécaniques d'un hydrogel se doivent également d'être ajustées. Le comportement mécanique du gel dépend en premier lieu des polymères qui le constituent. On peut distinguer les gels mous comme l'alginate ou l'agar qui sont viscoélastiques. Ils possèdent un faible module d'Young de l'ordre de 100 kPa. Au delà d'une certaine contrainte seuil, leur comportement devient plastique et leur déformation est alors irréversible. Il existe également des gels plus rigides comme le polyéthylène glycol diacrylate au module d'Young plus élevé compris entre 1 et 10 MPa. Ces hydrogels durs sont moins déformables et cassent au delà d'une contrainte seuil dite de rupture [41].

La rigidité d'un hydrogel dépend fortement de la densité de réticulation et de l'énergie de liaison. Il est donc possible de moduler ses propriétés mécaniques en modifiant la concentration en agent réticulant ou en polymère. D'autres facteurs permettent d'agir sur la structure de l'hydrogel comme le temps de réaction, le solvant ou encore la température de mise en forme [3].

Dans ce chapitre nous présentons la formulation d'un hydrogel conducteur pour créer à terme une capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel conductrice. Ce matériau doit donc posséder l'ensemble des propriétés énoncées précédemment mais également des propriétés de conduction électriques.

II.1.2 Les hydrogels conducteurs

En 1995, Guisseppi-Elie décrit pour la première fois une nouvelle classe d'hydrogels conducteurs. Ces hydrogels électroconducteurs sont des doubles réseaux qui combinent des polymères conducteurs et des hydrogels hautement hydratés [46]. Les polymères conducteurs regroupent un ensemble de macromolécules possédant des domaines étendus de liaisons π . Ces domaines confèrent aux polymères des propriétés électriques, électrochimiques et optiques uniques. On trouve dans cette famille des molécules possédant des cycles aromatiques comme les polyanilines, le poly(paraphénylene) où encore les polypyrroles. La synthèse d'hydrogel conducteur s'effectue généralement en deux étapes. Dans un premier temps, la matrice d'hydrogel est synthétisée. Les monomères conducteurs sont ensuite ajoutés puis polymérisés par oxydation ou par électro-polymérisation. Cette polymérisation au cœur de la matrice d'hydrogel permet l'obtention d'un double réseau hydrogel/polymères conducteurs. Des hydrogels conducteurs biocompatibles contenant du polypyrrole ont déjà été utilisés en biologie avec des cellules de mammifères et des tissus [42]. Ces hydrogels constituent aujourd'hui une piste prometteuse pour l'implantation de biocapteurs permettant la stimulation électrique de cellules *in vivo*.

Il existe peu d'exemples dans la littérature d'utilisation d'hydrogels conducteurs dans le domaine des piles bactériennes. Les études menées utilisent généralement le polypyrrole pour améliorer la conductivité d'électrodes de carbone en greffant le polymères sur leur surface [58, 125, 147]. Dans notre cas, l'utilisation de ce type polymère semble difficile à mettre en place. En effet, la synthèse de ces matériaux composites nécessite généralement plusieurs étapes non compatibles avec notre procédé de mise en forme des capsules à cœur liquide.

Une autre voie existe pour conférer à un hydrogel des propriétés conductrices. Elle consiste en l'intégration de particules solides conductrices dans la matrice d'hydrogel. Si elles sont introduites en quantité suffisante, ces particules peuvent se connecter pour former un réseau. Généralement, la connexion est déclenché par un stimulus (évaporation, changement brusque de température [37, 47]). C'est la voie de formulation que nous avons choisi. Le défi majeur de ces travaux de thèse est donc la création d'un hydrogel conducteur électronique par dispersion de particules solides conductrices. Ce type de formulation peut se révéler difficile pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la création de ces matériaux nécessite la dispersion d'une charge. Pour cela, on peut modifier chimiquement ou recouvrir la surface des particules pour compatibiliser celles-ci avec la matrice. Ces modifications sont ensuite généralement néfastes pour la conduction électronique car elle peuvent introduire des résistances de contact. De plus, en milieu liquide et mou, les particules ne sont pas contraintes physiquement. Cette liberté peut rendre difficile l'établissement de bons contacts électriques entre les particules. Nous verrons dans la suite comment il est possible de résoudre ces problèmes.

La synthèse de notre matériau repose sur la dispersion d'une charge conductrice dans une matrice liquide. Ces charges peuvent être choisies parmi un grand nombre de matériaux comme des particules de graphite [71, 105], de zinc [43], des nanotubes de carbones [82], du graphène [146].

Afin de permettre une connexion homogène au sein de l'hydrogel, la dispersion doit être stable le temps de la mise en forme du matériau.

II.1.3 Stabilité colloïdale de dispersions de particules solides

Les forces de van der Waals

Lorsque des particules de petites tailles ($< \mu m$) sont dispersées dans un solvant, l'agitation thermique et les forces de van der Waals jouent un rôle important dans le comportement du mélange. Le mouvement brownien est caractérisé par le déplacement aléatoire et la collision des particules sous l'effet de l'agitation thermique. Les forces de van der Waals sont des forces de faible intensité à longue portée. Elles sont la somme de trois interactions : les forces de Keesom (interactions dipôle-dipôle), les forces de Debye (interactions dipôle-dipôle induit) et les forces de London (interactions dipôle induit-dipôle induit).

Les forces de van der Waals entre deux particules s'exprime comme la somme des interactions moléculaires entre toutes les paires de molécules composant chaque particule. La formule obtenue dépend donc de la taille, la forme et la composition des particules.

À titre d'exemple, si l'on considère deux particules de rayon r , et distantes de h , avec $h \ll r$ les forces de van der Waals s'expriment alors :

$$F_{VDW} = -\frac{Hr}{12h} \quad (II.1)$$

avec H une constante positive, dite de Hamaker, dont l'ordre de grandeur est $10^{-19} - 10^{-20} J$.

Pour des particules similaires, les forces de van der Waals sont attractives et leur intensité augmente à mesure que la distance entre les particules diminue. Dans une dispersion colloïdale, la combinaison de l'agitation thermique et des interactions de van der Waals conduit le système vers l'agglomération. Il est donc nécessaire d'introduire des interactions répulsives pour stabiliser la dispersion.

Entre autres, ces interactions peuvent être de nature électrostatique ou stérique.

Stabilisation électrostatique Pour stabiliser électrostatiquement des particules, il faut créer des charges à leur surface. Ces charges peuvent provenir d'une ionisation de la surface dans un solvant, de l'adsorption ou du greffage d'entités chargées sur les particules. Après modification, toutes les particules doivent présenter une charge de surface de même signe. Il apparaît alors une double couche électrique. Celle-ci est constituée d'une couche de charges de surfaces et d'une couche diffuse de contre-ions dans la solution face à la première couche. Ces contre-ions font écran au champ électrique créée par la paroi chargée. Le profil de concentration en contre-ions présente un maximum au niveau de la surface et décroît en fonction de la distance à la surface avec une longueur caractéristique appelée longueur de Debye κ^{-1} . Elle

II.1. Un double réseau d'hydrogel et de charges dispersées

s'exprime en fonction de la concentration des ions i en solution loin de la surface c_{i0} :

$$\frac{1}{\kappa} = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k T}{\sum_i (z_i e)^2 c_{i0}} \right)^{1/2} \quad (\text{II.2})$$

avec ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide et ϵ_r la permittivité relative du solvant, k la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin et c_{i0} la concentration en ions de charge $z_i e$.

La stabilité d'une dispersion par répulsion électrostatique est donc le résultat d'une compétition entre les forces attractives de van der Waals et les forces de répulsion électrostatique. La théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) décrit cette compétition pour les faibles potentiels de surface et les faibles concentrations en ions.

Considérons deux surfaces de même charge, distantes de h . Le potentiel total d'interaction s'écrit comme la somme du potentiel attractif V_A et du potentiel répulsif V_R :

$$V(h) = V_A(h) + V_R(h) \quad (\text{II.3})$$

L'expression du potentiel peut être obtenue par l'intégration des forces de van der Waals et des forces de répulsion électrostatique à longue distance [36]. Il s'exprime alors en fonction de constantes du système et de h :

$$\frac{V(h)}{\text{Aire}} = -\frac{H}{12\pi h^2} + \frac{64kTc_0\Gamma_0^2}{\kappa} \exp(-\kappa h) \quad (\text{II.4})$$

avec H la constante de Hamaker, c_0 la concentration ionique en solution, Γ_0 une constante dépendant du potentiel de surface. Dans cette expression, la dépendance en h est modulée par la valeur de la longueur de Debye. Plus la longueur de Debye est grande plus le potentiel répulsif augmente. La figure II.1 représente qualitativement l'évolution de $V(h)$ entre deux plans chargés avec deux longueurs de Debye différentes.

Lorsque h est très grand ou très petit, le potentiel d'interaction est dominé par le terme attractif. Pour des valeurs intermédiaires de h , le potentiel répulsif devient non négligeable et forme une barrière de potentiel entre les conformations "dispersé" (h grand) et "agrégé" ($h = 0$). La hauteur de la barrière est fixée par l'intensité de la répulsion électrostatique qui elle-même dépend de la longueur de Debye. Comme on peut le voir sur la figure II.1, lorsque κ^{-1} est grand, la barrière de potentiel est importante, le système est typiquement stable d'un point de vue cinétique. Pour des valeurs de κ^{-1} faibles, la barrière est plus petite ou même non existante. Sans intervention extérieure, l'agitation thermique peut apporter de l'énergie au système et permettre le passage de l'état "dispersé" à l'état "agrégé". Le système devient alors instable.

Pour un système donnée, la valeur de κ peut donc conditionner la stabilité de la dispersion. Cette longueur est directement liée à la concentration des ions en solution.

Pour les raisons évoquées ci-dessus, la stabilisation électrostatique est donc sensible aux électrolytes, et applicable préférentiellement aux systèmes dilués.

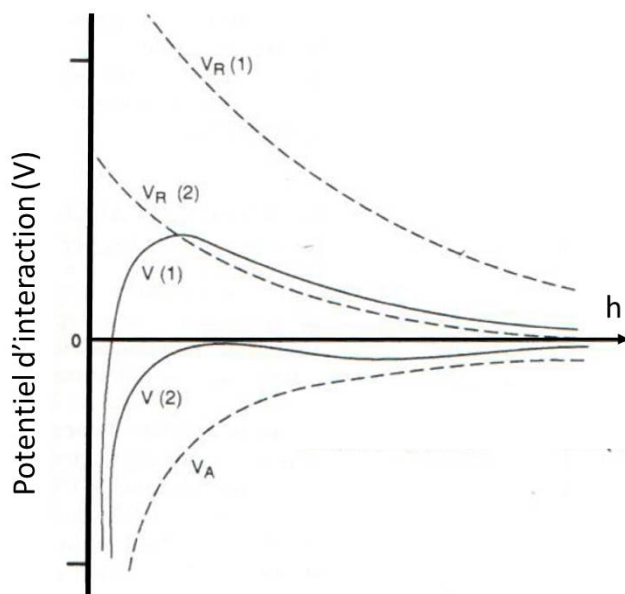


FIGURE II.1 – Représentation du potentiel d'interaction, somme du potentiel de répulsion V_R et du potentiel d'attraction V_A , pour deux longueurs de Debye différentes, κ_1 et κ_2 . $\kappa_1^{-1} > \kappa_2^{-1}$ [36].

Stabilisation par répulsion stérique

La stabilisation par répulsion stérique repose sur le greffage ou l'adsorption de macromolécules sur la surface des particules à disperser. Les macromolécules constituent alors une couche stabilisatrice d'épaisseur L à la surface des particules. L'origine de la répulsion polymérique est principalement entropique. La structure des polymères est conditionnée par le solvant de la dispersion. En bon solvant, les chaînes sont gonflées afin de maximiser leur entropie. Lorsque deux particules sont distantes de moins de $2L$, les couches de polymères interagissent suivant deux cas :

- Dans le cas où la densité de polymères en surface est faible, les couches polymères auront tendance à s'interpénétrer. Cette interpénétration diminue le nombre de degrés de liberté des chaînes et entraîne une réduction de l'entropie. L'énergie libre du système augmente donc, et les particules se repoussent.
- Dans le cas où la densité de polymères est importante, les couches de polymères auront tendance à se comprimer. Cette compression engendre également une augmentation de l'énergie libre du système et une répulsion des deux particules.

En bon solvant, la stabilisation par répulsion stérique est donc insensible aux électrolytes, et adaptée aux systèmes concentrés. Si elle a lieu, l'agrégation est généralement réversible.

La stabilisation de dispersions de particules solides dans un liquide nécessite donc l'ajout d'un composant à la surface de ces charges. Pour notre étude, nous avons décidé de nous tourner vers les tensioactifs. Ces molécules, décrites plus loin, peuvent s'adsorber sur des interfaces et les stabiliser par répulsions stériques et/ou électrostatiques.

II.1.4 Choix des matériaux

Il nous faut à présent sélectionner les composants de l'hydrogel conducteur c'est à dire un polymère constituant la matrice, une charge conductrice et un tensioactif stabilisant la dispersion de la charge en solution.

Pour la matrice d'hydrogel, le choix de l'alginate de sodium est privilégié car il est biocompatible et déjà utilisé au laboratoire pour la mise en forme des capsules décrites au chapitre précédent.

Parmi les charges envisageables, les nanotubes de carbone semblent particulièrement adaptés à la création d'un hydrogel composite conducteur. En effet, ces particules anisotropes (diamètre \ll longueur) possèdent un seuil de percolation bas. De plus, de nombreuses études démontrent que les nanotubes de carbone peuvent servir de support à la croissance de bactéries électroactives sous potentiel [74, 81, 125]. Certains nanotubes sont biocompatibles et les bactéries possèdent de bonnes propriétés d'adhésion sur les matériaux composites polymères/nanotubes de carbone [1, 81]. Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de nanotubes de carbone comme charges conductrices semble donc intéressante.

Concernant le tensioactif, nous avons choisi de tester plusieurs molécules afin de trouver la molécule adéquate à l'application finale de notre matériau.

Ces trois composants sont présentés plus en détails dans la suite de ce chapitre.

II.1.4.1 L'alginate, un polysaccharide biocompatible gélifiable

L'alginate est un polysaccharide naturel biocompatible issu de l'algue brune *Phaeophyceae* dont il représente plus de 40 % de la masse sèche. Un polysaccharide est une macromolécule constituée de monosaccharides liés par une fonction glycosidique C-O-C. L'alginate est un copolymère de deux monomères différents : le β -D-mannuronate (M) et le α -L-gulonate (G) (figure II.2).

L'enchaînement des monomères varie suivant le type d'alginate. Dans la chaîne, il existe des zones homopolymériques constituées uniquement de monomères G ou de monomères M. On parle alors de blocs G ou blocs M séparés par des séquences où G et M alternent (bloc MG).

La présence de groupements carboxyliques sur les cycles font de l'alginate un polyélectrolyte. Ces groupements lui permettent de gélifier en présence de cations divalents tels que le Ca^{2+} , Ba^{2+} , ou encore Mg^{2+} . Un hydrogel formé d'un polyélectrolyte combiné avec des ions multivalents de charge opposée est dit "ionotropique". Seuls les blocs G de la chaîne d'alginate possèdent une conformation compatible avec la réticulation de deux blocs par un cation divalent. La dimérisation de ces blocs forme une structure communément appelée "boite d'œufs". Cette complexation est illustrée sur la figure II.3(a). Elle est non covalente et donne lieu à la création d'un réseau rigide en trois dimensions rigide. L'hydrogel d'alginate est un gel physique donc réversible. En effet il est possible de resolubiliser l'hydrogel en ajoutant par exemple un chélatant du calcium.

L'alginate que nous utilisons est fourni par l'entreprise *FMC biopolymer*, sous la référence LF200FTS. Son contre ions est le sodium Na^+ . Au cours des ses travaux de thèse [113], Leslie

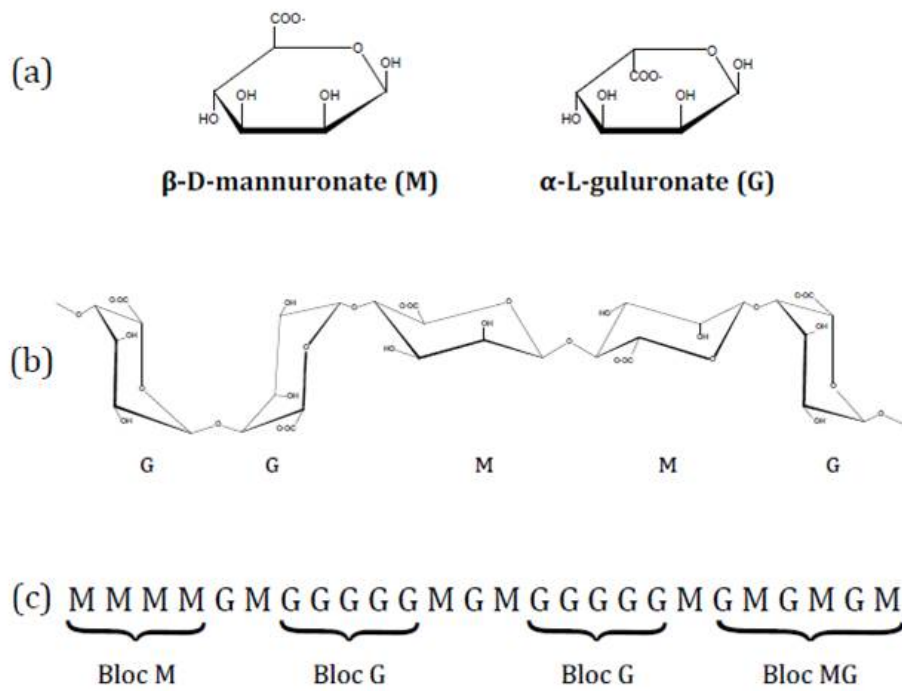


FIGURE II.2 – Structure et composition de l’alginate. (a) Monomères constituant l’alginate. (b) Exemple de conformation d’une chaîne d’alginate. (c) Enchaînement des monomères et distribution des blocs M et G [113].

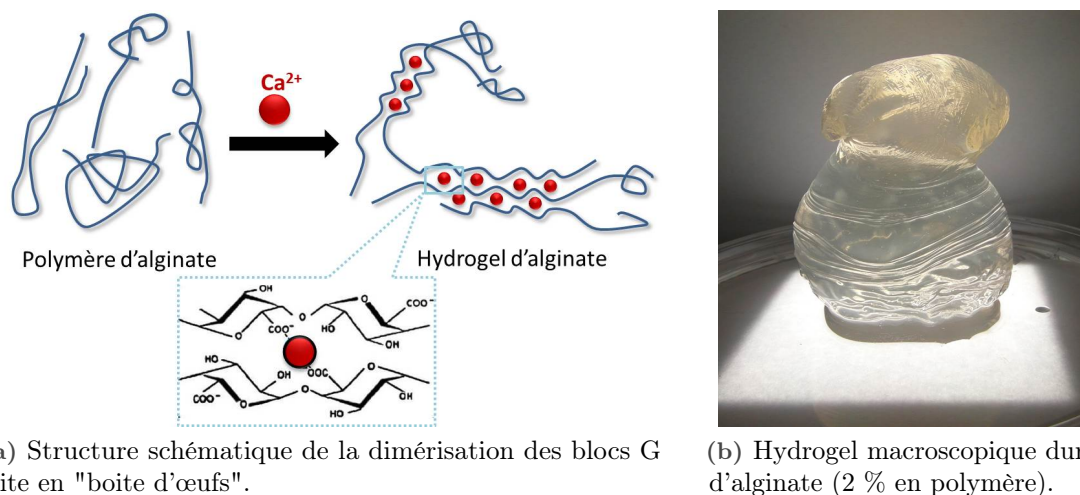


FIGURE II.3 – Gélification de l’alginate de sodium par du chlorure de calcium.

II.1. Un double réseau d'hydrogel et de charges dispersées

Rolland a caractérisé cet alginate. En l'absence d'agent chélatant comme le citrate de sodium, une solution d'alginate LF200FTS gélifie pour des concentrations de calcium supérieures ou égales à 10 mmol.L^{-1} [113] (voir figure II.3(b)). En effectuant des mesures de diffusion statique de la lumière à différents angles et différentes concentrations, Leslie Rolland a déterminé les grandeurs suivantes pour l'alginate LF200FTS :

- la masse molaire moyenne : $M_w = 150.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$
- le rayon de giration moyen : $R_g = 90 \text{ nm}$
- la concentration de recouvrement : $c^* = 77 \text{ g.m}^{-3} \sim 7,7.10^{-3} \%$ en masse

La concentration de recouvrement c^* correspond à la concentration à partir de laquelle les chaînes de polymères commencent à interagir entre elles. Elle est calculée à partir de la masse molaire moyenne, le rayon de giration moyen du polymère et le nombre d'Avogadro N_A :

$$c^* = \frac{M_w}{\frac{4}{3}\pi R_g^3 N_A}$$

Les concentrations d'alginate utilisées dans le cadre de notre étude sont comprises entre 1 % et 4 %. Ces pourcentages sont bien supérieurs à c^* ($\sim 1.10^{-2} \%$). Les mélanges étudiés seront donc dans un régime dit "concentré". Avant gélification, une solution d'alginate est une solution visqueuse dont on peut étudier la rhéologie. Durant ses travaux de thèse, Hugo Doméjean a effectué des mesures rhéologiques sur une solution d'alginate LF200FTS à 1,7 % *via* un rhéomètre avec une géométrie de type Couette. En mesurant la viscosité en fonction du taux de cisaillement, il constate le comportement rhéofluidifiant de la solution de polymère. À faible taux de cisaillement, un plateau newtonien apparaît et permet la détermination d'une viscosité à taux de cisaillement nul (η_o). Pour une solution d'alginate LF200FTS à 1,7 %, $\eta_o = 1.5 \text{ Pa.s}$ à 23° C , soit 1500 fois la viscosité de l'eau [30].

Dans la suite cette thèse, nous utiliserons le terme alginate et l'abréviation "Alg" pour désigner l'alginate LF200FTS.

II.1.4.2 Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone ont été précisément décrits par Sumio Iijima en 1991 à partir d'observations de microscopie électronique [56]. Dans des suies carbonnées issues d'une expérience d'arc électrique, Iijima constate la présence de longs filaments tubulaires. Il appelle ces structures nanotubes en raison de leur diamètre de quelques nanomètres. Les nanotubes de carbone sont constitués de feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes. Un feuillet de graphène est un plan d'atomes de carbone répartis au sein d'un réseau hexagonal. Lorsque le tube contient plusieurs feuillets, il est appelé nanotube multi-paroi (multi-walled nanotube, MWNT). S'il est composé d'un unique feuillet créant une seule paroi, on parle alors de nanotube simple paroi (single-walled nanotube, SWNT). Ces objets illustrés sur la figure II.4 sont fortement anisotropes. Leur diamètre est de l'ordre du nanomètre et leur longueur peut atteindre plusieurs dizaines de microns.

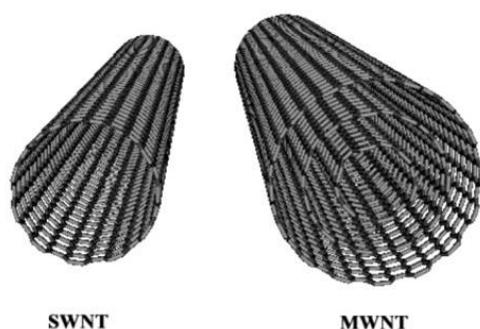


FIGURE II.4 – Représentation de nanotubes de carbone simple paroi (gauche) et multi-parois (droite).

En raison de la force de la double liaison carbone-carbone, les nanotubes sont considérés comme des matériaux à fort potentiel pour des applications mécaniques. Des études ont permis de mesurer des modules élastiques de l'ordre de 1000 GPa [101, 129] et des contraintes à la rupture théoriquement comprises entre 15 et 55 GPa [135, 137, 144]. Les nanotubes sont donc utilisés comme renfort dans des matériaux polymères comme le PVA [20, 116] ou les élastomères [31]. Une des applications porteuses pour les nanotubes est aujourd'hui le renfort de fibres polymères [57].

En plus de leurs propriétés mécaniques remarquables, les nanotubes de carbone montrent également une bonne conductivité électrique. Suivant l'arrangement des feuillets de graphène, plusieurs conformations peuvent apparaître. En 1995, Saito montre théoriquement que la conformation, le diamètre et l'hélicité déterminent le caractère métallique ou semi-conducteur des nanotubes de carbone monoparois. Les nanotubes multiparois quant à eux présentent tous un caractère métallique [115]. Les nanotubes de carbone métalliques présentent en théorie une conductivité de type balistique. Dans la pratique, la présence de défauts rend difficile l'observation de ce caractère. Typiquement, la résistivité ohmique de nanotubes multiparois de 10 nm de diamètre, est de l'ordre de $10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$ [34, 126]. La densité maximale de courant qu'ils peuvent supporter est de $10^9 \text{ A} \cdot \text{cm}^{-2}$ et est donc 10^5 fois supérieure à celle du cuivre. Dans le cadre de la synthèse d'un matériau composite conducteur, l'anisotropie des nanotubes de carbone permet d'abaisser considérablement le seuil de percolation. Les nanotubes dans une matrice polymère ont généralement un seuil de percolation électrique inférieur ou égal à 1% en masse [11]. Ce seuil de percolation bas est une des raisons majeures qui a guidé notre choix vers l'utilisation de nanotubes plutôt que d'autres matériaux carbonés comme le noir de carbone au seuil de percolation plus élevé ($\sim 30 \%$).

Les nanotubes utilisés lors de ces travaux de thèse ont été fournis par Arkema par l'intermédiaire du laboratoire Nanotubes et Graphène (NTG) du Centre de Recherche Paul Pascal de l'université de Bordeaux. Il s'agit de nanotubes multi-parois de la marque Graphistrength C100 (lot 6068). Ils comportent entre 5 et 15 parois. Ce lot de nanotubes a été caractérisé dans le cadre de la thèse d'Antoine Lucas au laboratoire NTG. Ils sont issus d'un procédé de fabrication continu par dépôt chimique en phase vapeur en présence de catalyseurs (C-CVD).

II.1. Un double réseau d'hydrogel et de charges dispersées

Tensioactif	$M_w(g/mol)$	Chaîne lipophile	Tête hydrophile	Ionique
Sodium dodécyle sulfate	288,38	C12	sulfate	oui
Brij 35	1198	C12	PEO	non
Brij 58	1124	C16	PEO	non
Brij 35	711	C18	PEO	non

Tableau II.1 – Tableau descriptif des tensioactifs testés dans la formulation d'un hydrogel composite "alginate/nanotubes de carbone". Cxx : chaîne d'alcane de xx atome de carbone , PEO : polyéthylène oxyde.

Les catalyseurs utilisés sont le fer et des particules d'alumine et constituent à posteriori des impuretés. Dans le lot 6068, ces impuretés sont présentes à hauteur de 7 %. Il est possible de diminuer ce pourcentage en purifiant les nanotubes par un traitement acide sous reflux. Dans nos travaux, nous avons décidé de ne pas purifier les nanotubes car ce traitement peut les dégrader et altérer leurs propriétés. Antoine Lucas a déterminé la longueur et le diamètre des nanotubes du lot 6068 par microscopie et diffusion dynamique de la lumière. En moyenne, les MWNT utilisés ont un diamètre de 10-15 nm et une longueur moyenne de 0,5 μm . Dans la suite nous utiliserons l'abréviation MWNT pour désigner les nanotubes multi-parois Graphistrength C100.

Après synthèse, les MWNT sont hydrophobes et fortement enchevêtrés. Ils apparaissent sous la forme de grains d'environ 0,5 mm. Afin de pouvoir les disperser efficacement dans une solution d'alginate, il faut dans un premier temps les individualiser. L'individualisation des nanotubes dans l'eau s'effectue par sonication en présence de tensioactif. Nous verrons par la suite que le choix de ce tensioactif est primordial dans la formulation de notre hydrogel composite conducteur.

II.1.4.3 Un éventail de tensioactifs

Un tensioactif est une molécule amphiphile. Il est composé de deux parties de polarité différente. L'une est hydrophobe et apolaire, l'autre est hydrophile et polaire. Cette classe de molécules permet de compatibiliser deux phases non miscibles (liquides, gazeuses ou solides). Dans notre cas, il s'agit de disperser et stabiliser une phase solide hydrophobe, les nanotubes de carbones, dans une phase liquide : l'eau. Au début de notre étude, nous avons décidé de tester plusieurs tensioactifs. Les molécules retenues ont des caractéristiques différentes en termes d'hydrophobie, de charge ou encore de masse molaire. Ils permettront dans la suite d'illustrer des phénomènes importants dans notre processus de formulation.

Les tensioactifs choisis pour cette étude sont décrits dans le tableau II.1. Leurs formules chimiques sont exposées sur la figure II.5. Le sodium docécyle sulfate (SDS) est déjà classiquement utilisé au LCMD dans le procédé de formation des capsules. Sa chaîne hydrophobe est composée de 12 atomes carbones. Il est ionique. Les autres tensioactifs choisis sont non ioniques. Ils font tous partie de la famille des Brij. Ils possèdent donc une structure commune qui consiste en une chaîne carbonée faisant office de chaîne lipophile et d'un oxyde de polyéthylène hydrophile. Leurs différences viennent principalement de la longueur de leur chaîne hydrophobe qui varie

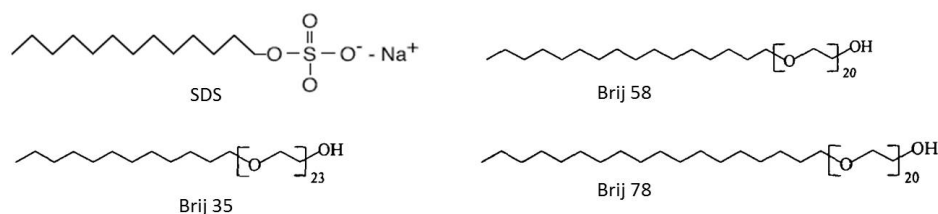


FIGURE II.5 – Représentation moléculaire semi-développée des tensioactifs testés pour la formulation d'un hydrogel composite conducteur.

entre 12 et 18 carbones.

Dans la mesure où nous voulons synthétiser un hydrogel biocompatible, le choix du tensioactif ainsi que sa concentration sont des variables importantes. À terme, l'hydrogel composite sera utilisé comme membrane dans une capsule enfermant des bactéries. Le processus de formation des capsules étant réalisé en une seule étape, les bactéries seront en contact avec l'hydrogel dès sa formation. Le tensioactif présent dans la membrane doit donc être compatible avec la culture de bactéries. Dans le cas contraire, il doit être introduit en concentration faible et éliminé rapidement pour ne pas perturber les métabolismes bactériens. En général, les tensioactifs chargés interagissent plus facilement avec les bactéries. Par exemple, les sels d'ammonium sont utilisés comme anti-septiques car ils se fixent aux groupements anioniques la paroi bactérienne. Ils perturbent alors la respiration et la division de la cellule. Le SDS peut donc être inhibiteur de la croissance bactérienne s'il est en trop grande concentration dans le milieu ($C > 1 \text{ mM}$) [53].

Dans la suite de ce chapitre nous exposons les différentes étapes de la fabrication de l'hydrogel composite "Alginate/Nanotube de carbone-tensioactif". Chaque étape est l'occasion d'explicitier les phénomènes physico-chimiques mis en jeu dans cette synthèse.

II.2 Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

L'hydrogel d'alginate/nanotubes de carbone multiparois (Alg/MWNT-tensioactif) est réalisé en 3 étapes. Les nanotubes sont d'abord dispersés dans l'eau par ultrasonication. L'alginate solubilisé est ensuite ajouté à la dispersion par agitation magnétique. Enfin, le mélange est gélifié par chute en goutte à goutte dans un bain de chlorure de baryum.

II.2.1 La dispersion des nanotubes par ultrasonication en présence de tensioactif

Sous leur forme commerciale, les nanotubes multi-parois Arkema 6068 sont enchevêtrés et agrégés sous la forme de grains millimétriques. Il faut dans un premier temps individualiser les MWNT et les stabiliser en milieu aqueux. On utilise pour cela des tensioactifs et l'ultrasonication.

II.2. Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

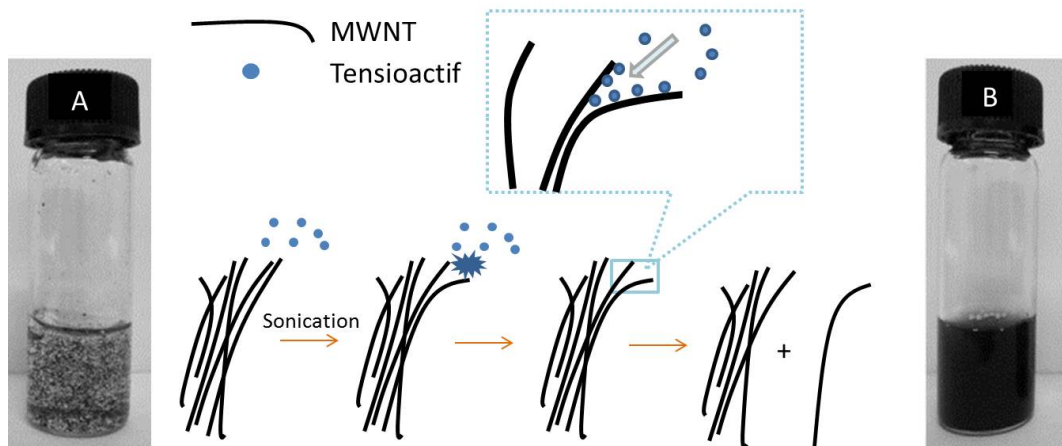


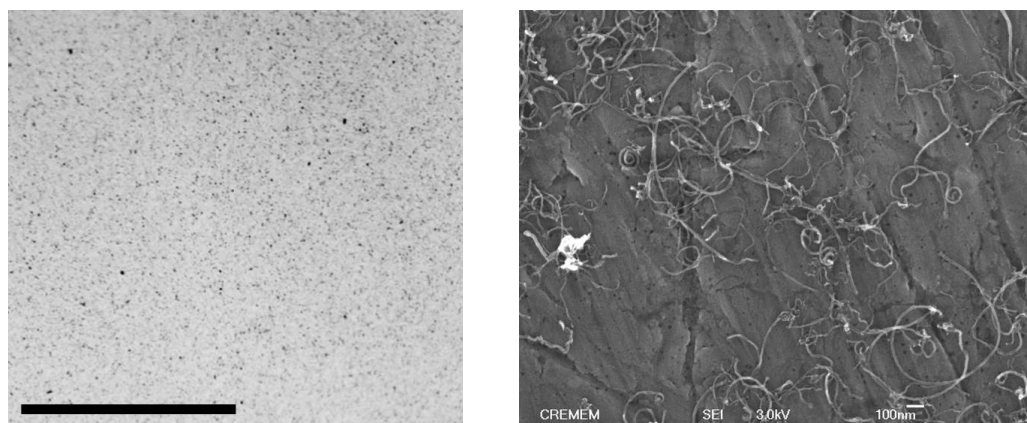
FIGURE II.6 – Individualisation d'un nanotubes depuis un faisceau *via* l'action combinée d'ultrasons et de tensioactifs. Photos : (A) MWNTs non dispersés sous forme d'agrégats dans l'eau ; (B) MWNTs dispersés par sonication en présence de tensioactif.

Les éléments piezoélectriques convertissent une énergie électrique en énergie mécanique. Dans un liquide, les ultrasons compressent et étirent localement le fluide. Cela entraîne des dépressions localisées. Lorsque que la pression devient localement inférieure à la pression de vapeur du liquide, des bulles de gaz apparaissent. Ces bulles sont appelées bulles de cavitation. Lorsqu'elles éclatent, leur environnement proche est soumis à un taux cisaillement élevé. En 2002, O'Connell et al. [93] montrent que la sonication est une méthode appropriée pour individualiser les nanotubes. Un an plus tard, Strano et al. [122] proposent un mécanisme pour décrire le détachement d'un nanotube d'un faisceaux de nanotubes. Ce mécanisme est exposé sur la figure II.6. Le cisaillement provoqué par les bulles de cavitation détache un bout de tube et crée une surface libre hydrophobe. Les tensioactifs en solution s'adsorbent alors sur le nanotube *via* leur partie lipophile et stabilisent l'interface nanotube/eau. À la manière d'une fermeture éclair, le nanotube se détache ensuite petit à petit jusqu'à donner un nanotube individualisé et stabilisé par une couche de tensioactif.

Cette technique s'avère être une voie efficace pour disperser les MWNT en milieu aqueux. Néanmoins, la dispersion par ultrasons peut entraîner une fragmentation des nanotubes lorsque l'énergie apportée à l'échantillon est trop grande [6]. Il faut donc choisir les conditions expérimentales avec précaution afin de pas altérer les MWNT.

Au laboratoire, la dispersion de nanotubes dans l'eau est réalisée par un générateur d'ultrasons VibraCell 750W. Les ultrasons sont appliqués en plongeant une sonde dans la solution de MWNT en présence de tensioactif. La sonde est un cylindre en alliage à base de titane de diamètre 3 mm. Pour éviter la surchauffe du système, les ultrasons sont appliqués par intervalles de 3 secondes d'application pour 1 seconde d'arrêt et l'échantillon est refroidi par un bain de glace.

Dans notre étude, un mélange de 10 mL de 2 % de MWNT avec 2 % de SDS est soumis aux ultrasons à une puissance $P_{us} = 7W$ pendant 1h15. Ce protocole correspond à une énergie totale par unité de volume de 3 kJ.mL^{-1} . À la fin de la sonication, on obtient une dispersion uniforme des MWNT comme en témoigne la figure II.7(a). En solution, les nanotubes ont un



(a) Cliché d'une dispersion de MWNT à 2 % avec 2 % de SDS. Echelle : $40\mu\text{m}$.

(b) Image MEB des MWNT individualisés après sonication, dilution et séchage (Crédit : Antoine Lucas).

FIGURE II.7 – Solution de MWNT à 2 % sonifié pendant 1h15 à $P_{us} = 7W$ en présence de 2 % de SDS.

mouvement brownien, leurs dimensions sont donc inférieures au micron [48]. Antoine Lucas a étudié la diminution de la longueur moyenne des MWNT Arkema 6068 en fonction de l'énergie totale apportée par ultrasons à l'échantillon. D'après ses travaux, une énergie de $3 \text{ kJ}\cdot\text{mL}^{-1}$ engendre une légère diminution de la taille des nanotubes. Leur longueur moyenne est alors de 350 nm.

La dispersion de MWNT peut être observée par microscopie électronique à balayage (MEB). La figure II.7(b) est un cliché MEB réalisé par Antoine Lucas sur une dispersion similaire à la notre, diluée 1000 fois. Cette photo permet de constater l'individualisation des nanotubes.

Pour tous les tensioactifs présentés précédemment, ce protocole a permis l'obtention de dispersions similaires. L'état des dispersions est vérifié par une méthode optique *via* des clichés de microscopie dans les mêmes conditions que la figure II.7(a).

Pour des raisons de toxicité, la quantité de tensioactif introduite dans la formulation doit être minimisée. Il est donc nécessaire de l'ajuster à la quantité de nanotubes que l'on veut disperser. Dans la suite, nous proposons d'optimiser la concentration de tensioactif par une méthode de tensiométrie.

II.2.2 Étude de l'adsorption des tensioactifs étudiée par tensiométrie

II.2.2.1 Effet des tensioactifs sur la tension de surface

En solution, un tensioactif est présent sous forme de molécules libres ou sous forme de micelles. Une micelle est un agrégat souvent sphérique de plusieurs molécules de tensioactif permettant de minimiser leur énergie de mélange dans le solvant. À température fixée, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément en micelles au delà d'une concentration seuil, la concentration micellaire critique (CMC).

II.2. Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

Dans la suite, on considère une interface entre deux fluides. On définit la tension de surface comme une variation d'énergie libre associée à une variation d'aire A entre ces deux fluides [19]. Elle s'exprime en J.m^{-2} ou en N.m^{-1} . Son ordre de grandeur pour des liquides à température ambiante est de plusieurs dizaines de mN.m^{-1} . Par exemple la tension de surface de l'eau dans l'air à 20°C est de 72.8 mN.m^{-1} .

De manière générale, l'interface entre deux fluides non miscibles est minimisée. Les propriétés de cette interface sont modifiées lorsque des tensioactifs sont ajoutés à l'une des deux phases. En effet, ces molécules peuvent diminuer la tension superficielle par adsorption à l'interface.

Soit un volume d'eau présentant une interface avec de l'air. On ajoute dans l'eau un tensio-actif (S) à une concentration inférieure à la CMC. Les molécules amphiphiles sont alors libres en solution ou adsorbées à la surface air/eau. Cette adsorption est réversible et un équilibre est atteint entre les deux états :



avec S_{sol} le tensioactif en solution, S_{ads} le tensioactif adsorbé à la surface, et k_{on} et k_{off} les constantes d'adsorption et de désorption du tensioactif à l'interface.

De nombreux modèles ont été proposés pour décrire l'évolution de la quantité de tensioactif sur une interface en fonction de sa concentration en solution C [21]. Le plus communément utilisé est l'isotherme de Langmuir :

$$\Gamma = \Gamma_m \frac{K_L C}{1 + K_L C} \quad (\text{II.5})$$

avec Γ la concentration surfacique de tensioactif adsorbé, Γ_m la concentration surfacique maximale en tensioactif adsorbés et K_L la constante de Langmuir d'équilibre d'adsorption (L.mol^{-1}).

Ce modèle est applicable pour un tensioactif unique, dans le cas d'une adsorption monocouche et pour des concentrations inférieures à la CMC. Il indique que lorsque la concentration en molécules amphiphiles augmente en solution, elle augmente également à l'interface. Cette augmentation entraîne la diminution de la tension de surface.

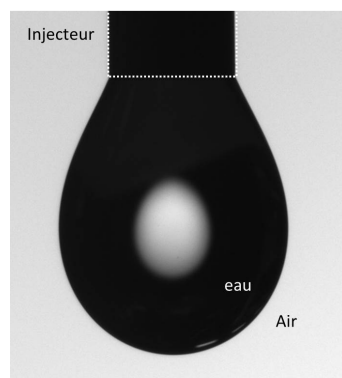
La concentration de tensioactif à la surface peut être reliée à la tension de surface γ *via* l'isotherme d'adsorption de Gibbs. Dans le cas d'un système ne contenant qu'un seul tensioactif à une concentration c inférieure à la CMC, elle s'écrit comme suit [32] :

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln c} \quad (\text{II.6})$$

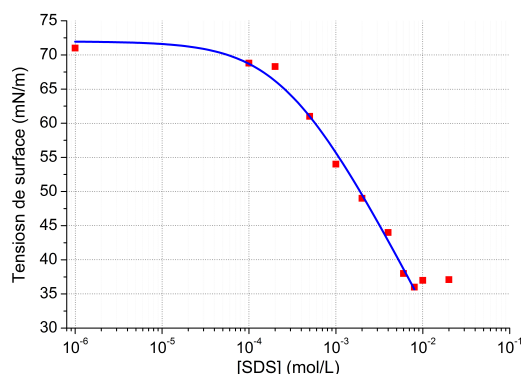
avec R la constante des gaz parfaits et T la température en Kelvin. En combinant (II.5) et (II.6), on retrouve alors l'expression de l'équation Szyszkowski [32] :

$$\gamma_0 - \gamma = RT \Gamma_m \ln(K_L c + 1) \quad (\text{II.7})$$

avec γ_0 la tension de surface du solvant sans tensioactif.



(a) Image d'une goutte d'eau dans l'air réalisée pendant la mesure dans un tensiomètre. Diamètre de l'injecteur : 1,82 mm.



(b) Évolution de la tension de surface d'une solution aqueuse de SDS en fonction de la concentration de SDS. La CMC est de 8 mmol.L⁻¹.

FIGURE II.8 – Méthode de la goutte pendante permettant la mesure tensions de surface et la détection de la CMC d'un tensioactif.

Au dessus de la CMC, la concentration en tensioactif libre devient stable alors que la concentration globale en tensioactif (libre + micelle) augmente. Ajouter des molécules revient alors à augmenter le nombre de micelles. La dynamique d'adsorption des molécules amphiphiles à l'interface est alors perturbée. Si l'on étudie l'évolution de la tension superficielle d'une interface eau/air en fonction de la concentration en tensioactif, on constate un plateau lorsque la CMC est atteinte [35]. Ce phénomène rend possible l'évaluation de la concentration micellaire critique d'un tensioactif à partir d'une mesure de tension superficielle.

II.2.2.2 Mesure de la CMC par la méthode de la goutte pendante

La méthode de la goutte pendante consiste à former une goutte au bout d'un injecteur au diamètre défini. Cette goutte est immergée dans un fluide avec lequel elle est immiscible, ici l'air. Sa forme résulte de l'équilibre entre la force de pesanteur qui s'applique sur elle et les forces capillaires qui la maintiennent attachée à l'injecteur. Dans le cas d'une goutte dans l'air, on obtient la configuration de la figure II.8(a).

Une analyse du profil de la goutte par un logiciel permet de remonter à la tension de surface γ du fluide.

Au laboratoire, nous avons utilisé un tensiomètre Krüss DSA30 et son logiciel d'analyse (Krüss Sw3262) pour déterminer la tension de surface de solutions aqueuses de sodium dodécyle sulfate. La concentration en SDS varie de 0 à 35 mmol.L⁻¹. La goutte a un volume voisin de 10 μ L. L'évolution de la tension de surface est suivie dans le temps jusqu'à sa stabilisation. L'équilibre est atteint rapidement au bout d'environ 30 secondes. Les tensions de surface mesurées à $t = 100$ secondes sont reportées sur la figure II.8(b) en fonction de la concentration de SDS. Les mesures sont réalisées à 21 °C. On peut déterminer la CMC. Elle vaut 8 mmol.L⁻¹. Cette valeur est en adéquation avec les valeurs données par la littérature.

II.2. Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

Les points expérimentaux sont ajustés *via* le logiciel Origin par l'expression (II.7). La courbe d'ajustement représentée en bleue sur la figure II.8(b) donne une valeur de Γ_m de $4,1 \cdot 10^{-6}$ mol.m⁻² soit une aire par tête polaire de SDS d'environ 0,4 nm².

Une expérience similaire effectuée avec le Brij35 permet de trouver une CMC de 0,1 mmol.L⁻¹ pour ce tensioactif. L'ajustement de la courbe $\gamma = f([Brij35])$ de la figure II.9(b) par l'expression (II.7) donne une valeur de Γ_m de $2,6 \cdot 10^{-6}$ mol.m⁻² soit une aire par tête polaire de Brij35 d'environ 0,65 nm².

II.2.2.3 Décalage de la CMC induit par les nanotubes de carbonés

Comme on l'a vu, la dispersion des nanotubes dans l'eau s'effectue par sonication et adsorption de tensioactifs à la surface des MWNT. La surface spécifique des nanotubes est très importante ($S_{sp} = 250$ m².g⁻¹ pour les MWNT Arkema) et entraîne l'immobilisation d'un grand nombre de molécules amphiphiles. À concentration totale en tensioactif fixée, la concentration en tensioactif libre est donc abaissée par ajout de nanotubes individualisés. La concentration micellaire critique apparente se trouve par conséquent augmentée. Le décalage entre la CMC et la CMC en présence de MWNT est noté ΔCMC . Il correspond à la quantité de tensioactif nécessaire à la stabilisation des nanotubes.

Ce décalage dépend de la quantité de nanotubes en solution, de leur état de dispersion (individualisés ou en agrégats) et du tensioactif utilisé.

Nous souhaitons connaître la quantité de tensioactif nécessaire à la stabilisation des 1 % de MWNT Arkema utilisés durant ces travaux de thèse. Dans ce but, une solution contenant de 1 % de nanotubes est soniquée pendant 1h15 en présence d'une concentration variable en tensioactif. Les conditions de sonication sont identiques à celles utilisées dans le paragraphe II.2.1. La concentration en tensioactif varie sur plusieurs décades. La dispersion est ensuite centrifugée à 8000 *g* pendant 1 heure. Le surnageant est récupéré puis analysé par méthode de la goutte pendante pour connaître sa tension de surface.

Les figures II.9(a) et II.9(b) montrent les tensions de surface obtenues pour deux tensioactifs : le SDS et le Brij35. Dans les deux cas, on observe un décalage de la courbe vers des concentrations plus élevées.

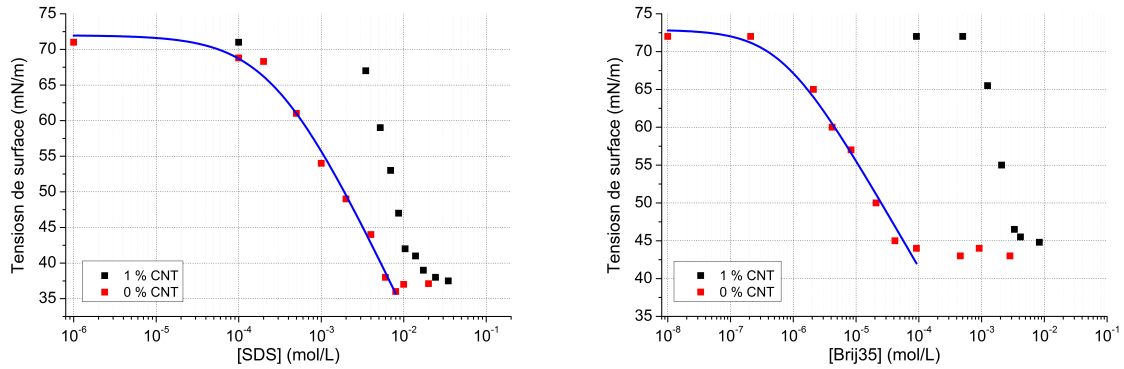
On estime que la nouvelle CMC vaut environ 20 mmol.L⁻¹ dans le cas du SDS et environ 4 mmol.L⁻¹ pour le Brij35. La valeur de ΔCMC_{SDS} est alors de 10 mmol.L⁻¹ et la valeur de ΔCMC_{Brij35} vaut 4 mmol.L⁻¹.

II.2.2.4 Calcul de l'aire par tête polaire à la surface des MWNT

À partir des mesures précédentes, il est possible d'estimer la surface occupée par une tête polaire de tensioactif à la surface des MWNT Arkema graphicstrenghtC100. Dans l'hypothèse d'une adsorption monocouche à la surface des nanotubes, on a :

$$A_{tp} = \frac{A_{MWNT}}{N_{Sad}}$$

avec A_{tp} la surface occupée par une molécule de tensioactif en m², A_{MWNT} l'aire totale des MWNT en solution en m² et N_{Sad} le nombre de molécules amphiphiles adsorbées. Soit un



(a) Évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en SDS sans MWNT et avec 1 % de MWNT après sonication. $\Delta CMC_{SDS} \sim 10 \text{ mmol.L}^{-1}$.

(b) Évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en Brij35 sans MWNT et avec 1 % de MWNT après sonication. $\Delta CMC_{Brij35} \sim 4 \text{ mmol.L}^{-1}$.

FIGURE II.9 – Décalage des CMC pour le SDS (a) et le Brij35 (b) par ajout de 1 % de MWNT.

volume V de dispersion, à la concentration massique C_{MWNT} en MWNT, on a alors :

$$A_{tp} = \frac{C_{MWNT} \cdot S_{sp} \cdot V}{\Delta CMC \cdot N_a \cdot V}$$

avec S_{sp} la surface spécifique des MWNT ($250 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et N_a le nombre d'Avogadro.

Le calcul donne :

Pour le SDS : $A_{tp} = 0,4 \text{ nm}^2/\text{molécule}$.

Pour le Brij35 : $A_{tp} = 1 \text{ nm}^2/\text{molécule}$.

On retrouve des valeurs similaires à celles obtenues précédemment dans le cas de l'adsorption des tensioactifs à l'interface eau/air. La valeur obtenue pour le SDS est en adéquation avec les grandeurs obtenues dans une étude de Grossiord et al. [45]. Ils déterminent le taux minimum de molécules de SDS nécessaire à l'obtention d'une suspension stable de SWNT, par analyse thermogravimétrique, mesure de tension de surface et spectroscopie UV-visible. Ils évaluent cette concentration à 2-3 molécules par nm^2 .

Cette étude nous a permis d'estimer la quantité minimale de tensioactif nécessaire à la stabilisation de 1 % de MWNT. Dans la formulation de notre matériau nous devons donc fixer la concentration en tensioactif au dessus de cette limite basse.

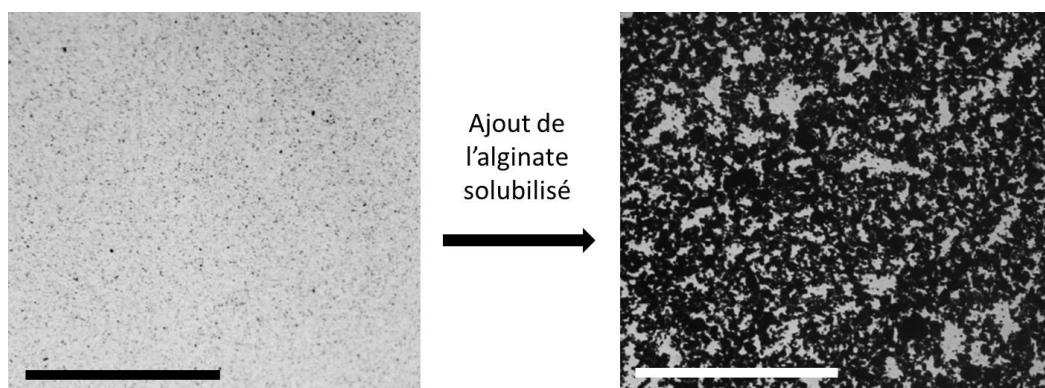
Dans la suite, nous choisissons d'utiliser 16 mmol.L^{-1} ($\sim 0,5 \%$) de SDS par % de MWNT pour toutes nos dispersions utilisant le SDS. De même, les dispersions de MWNT utilisant du Brij35 seront réalisées avec $6,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\sim 0,75 \%$) de Brij35 par % de MWNT. La structure similaire des différents Brij, nous a incité à utiliser les mêmes rapports de concentrations que celui du Brij35 lors de l'utilisation de ces tensioactifs.

Dans la suite de ce chapitre, les concentrations en tensioactif ne seront pas indiquées. Elles dépendent des pourcentages de MWNT *via* les rapports indiqués ci-dessus.

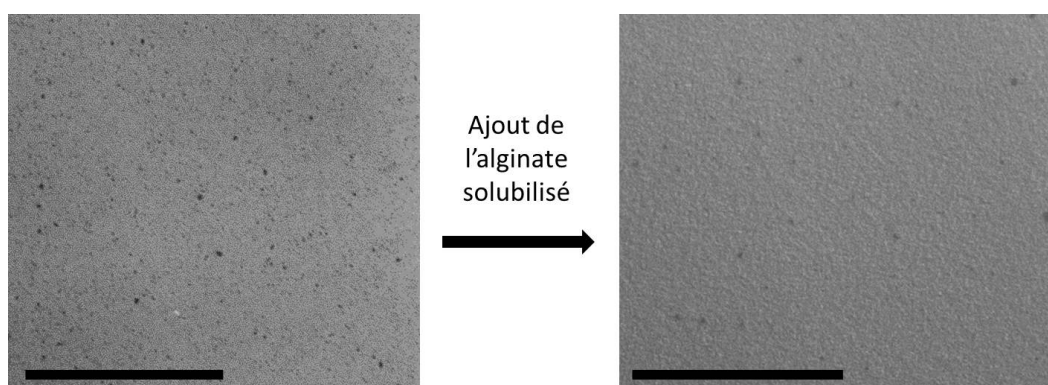
II.2. Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

Après avoir décrit et ajusté la formulation des dispersions de MWNT, il faut à présent ajouter l'alginate de sodium pour obtenir un mélange gélifiable.

II.2.3 Les mélanges Alginate/Nanotubes de carbone



(a) Image de microscopie optique de la dispersion de MWNT 2%-SDS avant (gauche) et après l'ajout d'alginate de sodium (droite). Le mélange de droite a la composition suivante : Alg 1% / MWNT 1%-SDS.



(b) Image de microscopie optique de la dispersion de MWNT 2%-Brij35 avant (gauche) et après l'ajout d'alginate de sodium (droite). Le mélange de droite a la composition suivante : Alg 1% / MWNT 1%-Brij35.

FIGURE II.10 – Différents types de mélanges Alginate/MWNT-tensioactif. (a) cas d'un tensioactif ionique, (b) cas d'un tensioactif non ionique. Échelles : 400 μm .

L'alginate est solubilisé dans de l'eau milliQ à la concentration de 4 %. Cette solution et une dispersion de MWNT à 2 % en nanotubes, constituent les deux composants principaux du mélange gélifiable. Des mélanges sont formulés avec les proportions suivantes : 1 % d'alginate, 1 % de MWNT et différents tensioactifs : le SDS, le Brij35, le Brij58 et le Brij78. Tous les composants sont mélangés par agitation magnétique pendant 12 heures à température ambiante puis observés sous lame au microscope. On distingue alors deux types de mélanges illustrés par les figures II.10(a) et II.10(b).

Les dispersions de MWNT utilisant le SDS sont fortement déstabilisées par l'ajout de l'alginate de sodium. Des agrégats sont formés. Au contraire les dispersions utilisant les différents Brij ne semblent pas déstabilisées. L'observation directe au microscope montre

uniquement la disparition du mouvement brownien des nanotubes en raison de l'augmentation de la viscosité du mélange par ajout d'alginate.

II.2.3.1 Déstabilisation d'une dispersion de nanotubes par ajout d'alginate de sodium

Il est possible d'apporter des éléments de réponse quant à la déstabilisation de la dispersion de MWNT-SDS par ajout d'alginate. Nous avons tout d'abord interprété cette agrégation comme un déplacement du tensioactif. En effet, l'ajout d'une macromolécule en solution peut introduire une compétition d'adsorption entre le tensioactif et la chaîne polymère à la surface du nanotube. Si la chaîne polymère s'adsorbe à la surface des MWNT en remplaçant le tensioactif, elle peut créer un pontage entre les nanotubes. Ce pontage entraîne la floculation du système et les nanotubes jouent alors le rôle de point de réticulation des chaînes de polymère. Par exemple, en mélangeant de l'alcool polyvinylique avec des dispersions de nanotubes, Jestin et al. [57] ont constaté la déstabilisation du mélange pour des tensioactifs à chaîne carbonée courte (C12). Le polymère semble déplacer le tensioactif et créer des ponts entre les nanotubes. Dans leur étude, ce phénomène est évité par l'utilisation d'un tensioactif à chaîne carbonée plus longue (C18) et donc plus hydrophobe.

Nous avons donc remplacé le SDS dans notre formulation par de l'oléate de sodium, un tensioactif ionique ayant une chaîne carbonée C18. Cependant l'agrégation par ajout d'alginate a encore été constatée. Le pontage ne semble donc pas être l'explication première de l'agrégation des MWNT.

Nous pensons que la déstabilisation des mélanges provient de la nature des répulsions introduites pour effectuer la dispersion des nanotubes. L'utilisation de tensioactifs ioniques introduit des répulsions électrostatiques alors que les tensioactifs de type Brij génèrent des répulsions stériques. Ces deux répulsions sont opposées aux forces de van der Waals présentes dans la dispersion.

Les répulsions électrostatiques entre deux particules dispersées peuvent être modulées par la concentration des ions en solutions. L'ajout d'ions en solution diminue la longueur de Debye et par conséquent l'intensité des répulsions.

Nous avons étudié la stabilité d'une dispersion MWNT 1%-SDS 0,75 % en fonction de la concentration de chlorure de sodium (NaCl) en solution. L'agrégation des nanotubes a été constatée pour des concentrations en NaCl supérieures ou égale à $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, soit une concentration en porteurs de charge de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Il est donc possible de déstabiliser une dispersion de nanotubes par simple ajout de sel dans le cas d'une stabilisation électrostatique.

Dans le cas des mélanges Alg/MWNT-SDS, un polyélectrolyte, l'alginate de sodium, est incorporé à la dispersion de nanotube. Il est difficile de définir une concentration en ions dans le cas de polymères chargés. On peut tout de même estimer la concentration en porteurs de charge dans une solution à 1 % ($6,7 \cdot 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$) d'alginate de sodium. La masse molaire de l'alginate de sodium utilisé est de $150 \cdot 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Chaque monomère de la macromolécule possède un groupe carboxylique chargé négativement et un ion sodium chargé positivement. Connaissant la masse du monomère (195 g.mol^{-1}), il est possible d'estimer la concentration en

II.2. Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

porteurs de charges dans une solution d'alginate de sodium à 1 % en supposant une dissociation totale :

$$[\text{charges}] = 2 * \frac{M_{\text{alg}}}{M_{\text{mono}}} * C_{\text{alg}} = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$$

La concentration en porteurs de charge dans une solution d'alginate à 1 % est de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Cette concentration est inférieure à la concentration de déstabilisation critique constatée par ajout de NaCl. Elle est cependant du même ordre de grandeur. Dans nos mélanges, cette concentration semble suffisante pour abaisser significativement la barrière de potentiel répulsive et générer l'agrégation du mélange. De plus, il est important de noter que les mélanges sont réalisés à partir d'une solution d'alginate à 4 %. Lors du mélange, la concentration locale en ions est donc supérieure à celle calculée ci-dessus.

contrairement au SDS, les Brij sont des tensioactifs neutres composés d'une chaîne carbonée hydrophobe et une chaîne hydrophile. La chaîne hydrophile est un oxyde de polyéthylène (PEO) de masse molaire voisine de 10^3 g.mol^{-1} . Dans le cas des dispersions MWNT-Brij, Les MWNT sont donc couverts d'une couche de PEO en bon solvant. On est dans le cas d'une stabilisation par répulsion stérique. L'ajout d'un polyélectrolyte ne perturbe pas la répulsion. Les dispersions restent donc stables.

Il est important de garder à l'esprit que les propriétés mécaniques du mélange doivent être compatibles avec le processus de formation des capsules à cœur liquide. Il est donc cohérent de s'intéresser à présent à l'effet de l'ajout de nanotubes sur les propriétés physiques de la solution d'alginate.

II.2.3.2 Propriétés rhéologiques des mélanges Alginate/MWNT

L'incorporation de particules colloïdales dans des solutions de polymères peut modifier significativement les propriétés d'un mélange [112]. Pour explorer l'impact de l'addition des MWNT à la solution d'alginate, des mesures rhéologiques ont été effectuées sur des solutions Alg/MWNT-tensioactif. Deux mélanges utilisant soit le SDS soit le Brij78 sont comparés à une solution d'alginate à 1 %. Les mesures sont réalisées avec un rhéomètre TA Instruments de modèle AR1000 en géométrie Couette.

Sur la figure II.11, la viscosité des mélanges est tracée en fonction du taux de cisaillement. La solution d'alginate simple possède un caractère rhéofluidifiant pour les hauts taux de cisaillement, puis newtonien pour les taux plus faibles. L'ajout de nanotubes de carbone dispersés modifie la viscosité de la solution d'alginate. Dans le cas des mélanges Alg/MWNT-Brij78, les solutions sont également rhéofluidifiantes. Leur viscosité à bas taux de cisaillement semble tendre vers un comportement newtonien avec une valeur au plateau augmentée par rapport à une solution d'alginate seul.

La viscosité des mélanges Alg/MWNT-SDS évolue différemment. Ces mélanges sont rhéofluidifiants mais leurs viscosités ne tendent pas vers un plateau newtonien. Vers les faibles taux de cisaillement, la viscosité apparente augmente fortement jusqu'à atteindre 10 voire 50 fois la viscosité de l'alginate seul.

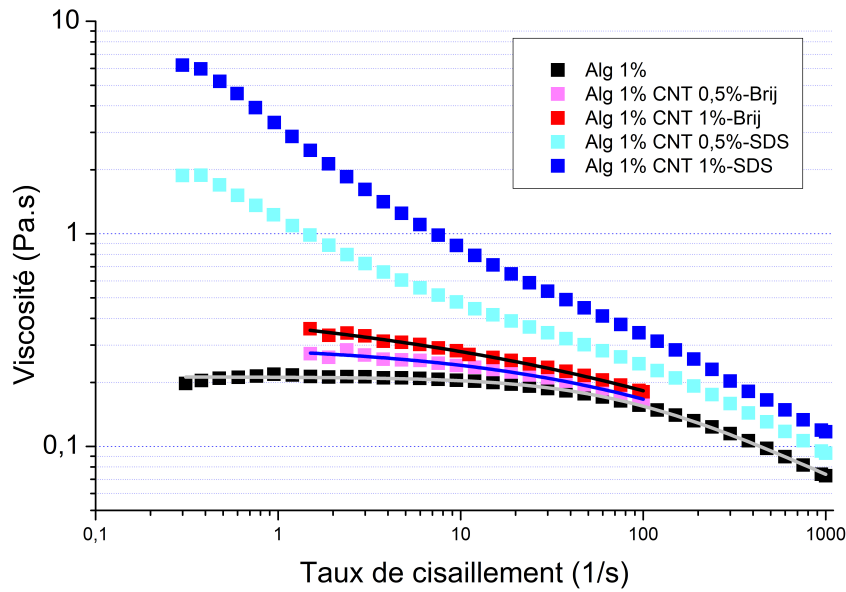


FIGURE II.11 – Évolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour des mélanges Alg 1 %/MWNT 1% ou 0,5 %-tensioactif. Les tensioactifs sont le SDS et le Brij78. La courbe Alg 1 % ne contient pas de nanotubes ni de tensioactif. Les lignes pleines représentent l'ajustement des points expérimentaux par le modèle de Carreau-Yasuda.

Ces courbes peuvent être ajustées par un modèle de Carreau-Yasuda [83][13]. Ce modèle empirique décrit l'évolution de la viscosité d'une solution rhéofluidifiante en fonction du taux de cisaillement :

$$\eta = \eta_0 \left(1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c} \right)^a \right)^{\frac{n-1}{a}} \quad (\text{II.8})$$

avec η la viscosité, η_0 la viscosité à taux de cisaillement nul, $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement, $\dot{\gamma}_c$ le taux de cisaillement critique marquant le passage du régime newtonien au régime rhéofluidifiant, n est un exposant sans dimension décrivant la variation apparente de la viscosité en fonction du taux de cisaillement dans le régime non-newtonien. Pour les matériaux rhéofluidifiants, $n < 1$. a est un autre paramètre sans dimension permettant de mieux décrire la transition entre les deux régimes. L'expression ci-dessus est valable dans l'hypothèse où $\eta_0 \gg \eta_\infty$, η_∞ étant la viscosité à taux de cisaillement infini.

La courbe "Alg 1 %" est ajustée par le modèle de Carreau-Yasuda. Il nous donne la viscosité à taux de cisaillement nul, $\eta_0 = 0,21$ Pa.s. Dans le cas de nanotubes dispersés par du Brij78, la viscosité augmente légèrement en fonction du pourcentage de MWNT ajouté. Les courbes Alg/MWNT-Brij78 sont toujours ajustables par le modèle de Carreau-Yasuda qui donne les viscosités η_0 suivantes : $\eta_0(0,5\% \text{ MWNT}) = 0,30$ Pa.s et $\eta_0(1\% \text{ MWNT}) = 0,54$ Pa.s.

Dans le cas du SDS, la viscosité est modifiée de manière significative. Ces courbes ne sont plus ajustables par le modèle de Carreau-Yasuda. Il est possible d'expliquer qualitativement

II.2. Étude du mélange Alginate/Nanotubes de carbone et mise en forme de l'hydrogel

ce phénomène. Nous pensons que cette perturbation de la viscosité est due à la déstabilisation des nanotubes dispersés avec du SDS par ajout d'alginate. Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'ajout d'alginate dans une dispersions de MWNT-SDS engendre la déstabilisation de celle-ci et l'agrégation des nanotubes sous forme d'agrégats micrométriques. L'augmentation de la viscosité de solutions de polymères par ajout de particules colloïdales a déjà été étudiée dans la littérature [59, 99]. La viscosité d'une suspension de sphères dures peut être décrite par la loi de Doolittle [23, 55] :

$$\frac{\eta_0}{\eta_s} = \exp\left(1,15 \frac{\Phi}{\Phi_m - \Phi}\right) \quad (\text{II.9})$$

avec $\Phi_m = 0,638$, Φ la fraction volumique des sphères, et η_s la viscosité du solvant.

La floculation des nanotubes sous forme d'agrégats peu denses fait augmenter leur volume apparent et donc leur fraction volumique effective dans le mélange. La viscosité à taux de cisaillement nul s'en trouve augmentée. L'augmentation de la fraction volumique peut aboutir à une transition de type sol-gel pour les mélanges contenant plus de 1,5 % de nanotubes. Dans le cas des suspensions stabilisées par le Brij, les nanotubes sont encore individualisés et leur fraction volumique est faible au sein du mélange Alginate/MWNT. Ils modifient donc peu la viscosité apparente.

L'utilisation du SDS modifie fortement les propriétés rhéologiques d'une solution Alginate/MWNT-tensioactif par rapport à une solution d'alginate simple. Ce phénomène risque de perturber le processus de fabrication des capsules à cœur liquide. Nous avons tout de même essayé d'utiliser les mélanges Alg/MWNT-SDS pour créer des capsules mais sans succès. Ces mélanges ne permettent pas l'obtention de capsules à membrane fine. Le ratio des débits ($R_q = Q_{\text{cœur}}/Q_{\text{membrane}}$) maximal atteignable est de l'ordre de 0,4. Ce ratio correspond à des membranes finales d'environ 600 μm d'épaisseur.

Nous décidons donc de ne pas utiliser le SDS pour stabiliser les dispersions de MWNT. Cependant, nous avons vu qu'il est indispensable dans la formulation de la membrane d'hydrogel de la capsule à cœur liquide. On ajoutera donc une faible concentration de SDS (1 mmol.L^{-1}) dans le mélange Alg/MWNT-tensioactif avant de l'utiliser pour fabriquer des capsules.

Les mélanges Alg/MWNT-Brij35 additionné de 1 mM de SDS permettent la fabrication de capsules à membrane Alg/MWNT fines. L'épaisseur de la membrane peut être abaissée jusqu'à 180 μm ($R_q = 2.5$).

L'étude des mélanges Alginate/MWNT-tensioactif nous a permis d'éliminer les tensioactifs ioniques de la liste des tensioactifs possibles pour la formulation d'un hydrogel composite conducteur.

II.2.4 Protocole complet de fabrication de billes Alginate/MWNT

Il convient à présent de gélifier le mélange Alg/MWNT-tensioactif pour étudier sa conductivité. Pour faciliter la caractérisation de l'hydrogel, nous avons choisi de le gélifier sous forme de billes pleines. Les billes sont obtenues par stillation des mélanges gélifiables dans une solution

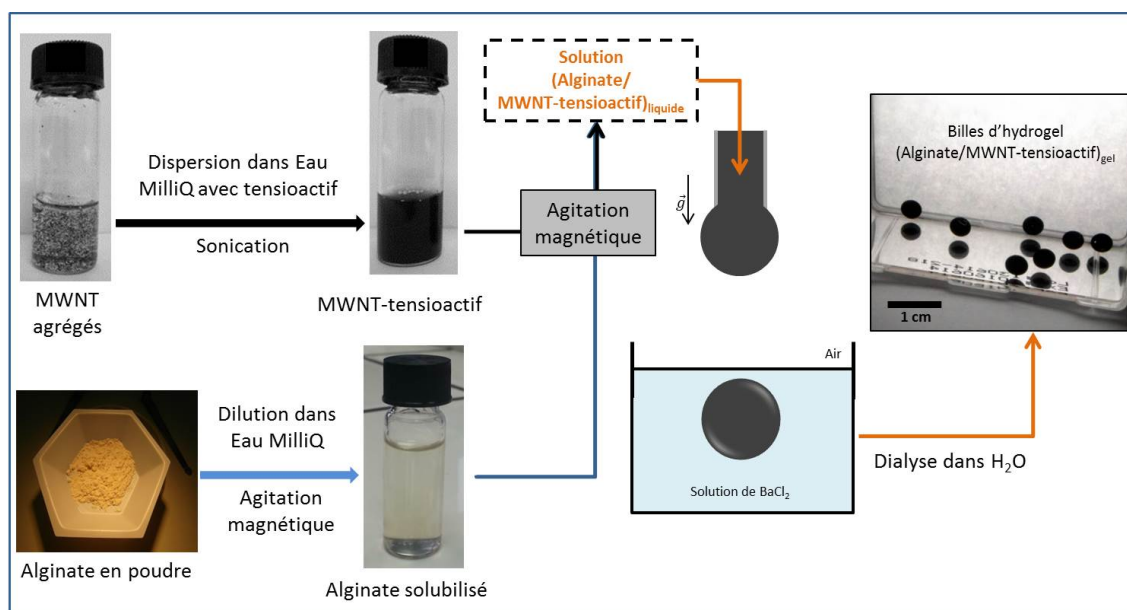


FIGURE II.12 – Protocole de synthèse de l'hydrogel Alginate/MWNT-tensioactif depuis la poudre d'alginate et les agrégats de nanotubes jusqu'aux billes pleines d'hydrogel composite.

de chlorure de baryum à 100 mmol.L^{-1} . Les billes sont laissées 1h sous agitation dans le bain de baryum afin d'assurer la gélification complète des sphères.

Dans le but d'apporter une vision globale, le protocole complet de mise en forme de l'hydrogel composite est illustré sur la figure II.12.

D'une part les nanotubes multiparois sont individualisés et stabilisés dans l'eau par sonication en présence de tensioactifs. D'autre part l'alginate est solubilisé dans de l'eau MilliQ par agitation magnétique. Les deux solutions sont ensuite mélangées pendant 12 heures par agitation magnétique. Le mélange homogène Alg/MWNT-tensioactif est ensuite gélifié par goutte-à-goutte dans un bain de $BaCl_2$.

Les billes obtenues sont ensuite dialysées dans un grand volume d'eau MilliQ pendant 48h puis conservées dans une solution à 5 mM de $BaCl_2$ pour une utilisation ultérieure. Dans une optique de biocompatibilité, la dialyse a pour but de diminuer fortement la concentration en tensioactif dans le gel. Ce lavage permet au minimum l'élimination des tensioactifs non adsorbés à la surface des MWNT.

Ce protocole permet d'obtenir des billes Alginate/MWNT-tensioactif identiques de rayon moyen 1,75 mm. Ces billes d'hydrogel millimétriques sont nos objets d'études pour la suite de ce chapitre. Elles contiennent 1 % d'alginate et des pourcentages variables de nanotubes de carbone allant de 0 à 2 %. Dans la suite on se propose de caractériser la conductivité des billes Alginate/MWNT-Brij35 par impédancemétrie.

II.3 Caractérisation de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par impédancemétrie

II.3.1 Mesure de conductivité par impédancemétrie

L'impédancemétrie consiste en la mesure de l'impédance complexe d'un matériau sur une plage de fréquences donnée. On obtient alors :

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + iZ''(\omega)$$

L'impédance mesure la conductivité des charges libres et des charges liées du matériau étudié. Usuellement, la partie réelle de l'impédance $Z'(\omega)$ représente la résistivité du matériau et donc sa conductivité. La partie imaginaire $Z''(\omega)$ représente les effets capacitifs et inductifs du matériau. La partie réelle est généralement décomposée en deux contributions. La première concerne la contribution des charges libres. Elle est en théorie indépendante de la fréquence. La seconde concerne la contribution des charges liées, on parle de pertes diélectriques. Cette contribution dépend de la fréquence.

L'impédancemétrie permet l'étude de matériaux composites polymères/MWNT. Elle donne accès aux constantes diélectriques et aux propriétés de conduction électrique de la matrice isolante contenant des particules conductrices [127] [134]. Notre objectif principal est de démontrer que le réseau de MWNT présente une conductivité électronique au sein de la matrice ionique d'alginate gélifiée. Cette conductivité est critique pour l'utilisation de notre matériau dans le domaine des piles bactériennes. L'impédancemétrie représente donc une voie intéressante pour la caractérisation de notre hydrogel Alg/MWNT-Brij35.

Dans notre étude, l'impédance complexe des billes Alg/MWNT-tensioactif est mesurée par un analyseur d'impédance Material Mates 7260. Pour chaque mesure, une bille est placée entre deux électrodes métalliques reliées à l'impédancemètre. Les électrodes sont distantes de 3 mm. Cette longueur est inférieure au diamètre des billes (3,5 mm) afin de les compresser légèrement et permettre un bon contact entre les électrodes et le gel. L'électrode supérieure est un disque de 1 mm de rayon. L'électrode inférieure est un disque de 3 cm de rayon. La mesure est réalisée dans l'air et à température ambiante.

II.3.2 Mesures brutes d'impédancemétrie

II.3.2.1 Influence des nanotubes sur l'impédance de l'hydrogel

Une série de billes d'alginate et nanotubes de carbones est étudiée par mesure d'impédance. Les MWNT sont stabilisés par le Brij35. Les billes sont fabriquées suivant le protocole décrit dans la partie II.2.4. Le pourcentage de nanotubes varie de 0 à 2 %. Les billes étudiées sont conservées dans une solution tampon de BaCl_2 à 5 mmol.L^{-1} .

Avant d'être placée dans la cellule de la mesure, la bille est prélevée de sa solution de conservation et l'eau extérieure la recouvrant est ôtée par un papier absorbant. Une fois la bille positionnée, l'impédancemètre mesure l'impédance complexe de l'hydrogel.

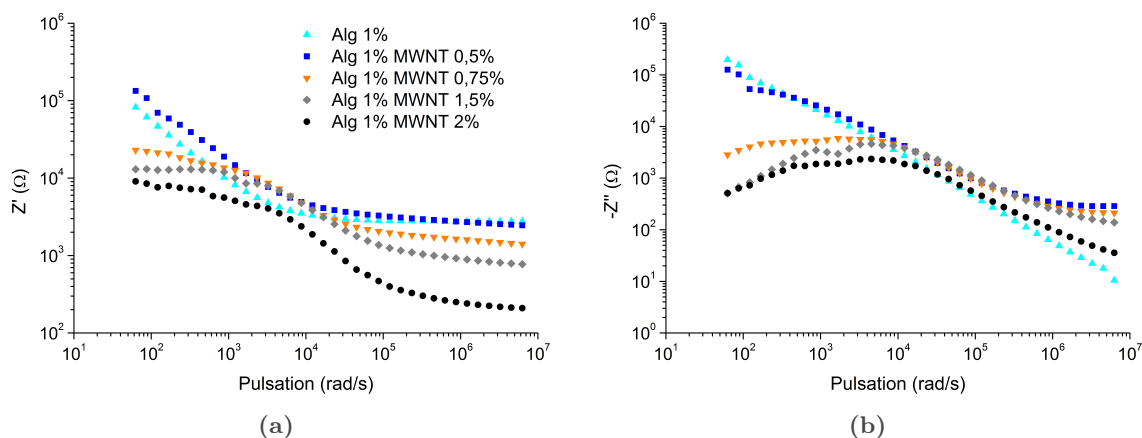


FIGURE II.13 – Mesures brutes de l'impédance complexe de billes d'alginate 1 % en fonction du pourcentage de MWNT. (a) Partie réelle en fonction de ω . (b) (-1) *Partie imaginaire en fonction de ω .

La figure II.13 présente l'évolution de la partie réelle et de la partie imaginaire de l'impédance de billes Alg/MWNT en fonction de la fréquence. Plusieurs matériaux contenant des pourcentages de MWNT différents ont été étudiés de cette manière. Cependant, pour plus de clarté, seulement cinq des courbes obtenues sont représentées ici.

On distingue deux comportements dans la plage de fréquences observée. Pour les pourcentages de MWNT inférieurs à 0,5 %, la partie réelle est constante à haute fréquence et décroît rapidement à basse fréquence. La partie imaginaire décroît en valeur absolue de manière rapidement en fonction de la fréquence. Pour les pourcentages en MWNT supérieurs à 0,75 % l'évolution de l'impédance diffère. Sa partie réelle semble constante à basse fréquence, puis elle diminue pour atteindre un second plateau à haute fréquence. La partie imaginaire présente elle aussi un comportement différent de celui des faibles pourcentages en MWNT vers les basses fréquences.

Le système étudié est un réseau ionique, les ions en solution, couplé à un réseau solide : le double réseau Alg/MWNT. L'impédancemètre mesure donc à la fois la conductivité liée au fond ionique et celle de la partie solide de l'hydrogel composite. Il est donc intéressant de faire varier la concentration du fond d'ions afin d'évaluer l'impact de la conductivité des ions sur notre mesure d'impédancemétrie.

II.3.3 Influence du fond ionique sur l'impédance de l'hydrogel

Des séries de mesures complémentaires ont été effectuées sur des billes Alg/MWNT-Brij35 équilibrées dans deux solutions à concentrations en chlorure de baryum différentes : 0,05 mM, 50 mM. La figure II.14 représente l'évolution de la partie réelle de l'impédance mesurée dans chacun des deux cas pour des matériaux contenant différents pourcentages en nanotubes.

Pour chaque concentration, on retrouve les deux comportements évoqués précédemment pour les faibles pourcentages ($\%(\text{MWNT}) \leq 0,5 \%$) et les hauts pourcentages en MWNTs ($\%(\text{MWNT}) \geq 0,75 \%$).

II.3. Caractérisation de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par impédancemétrie

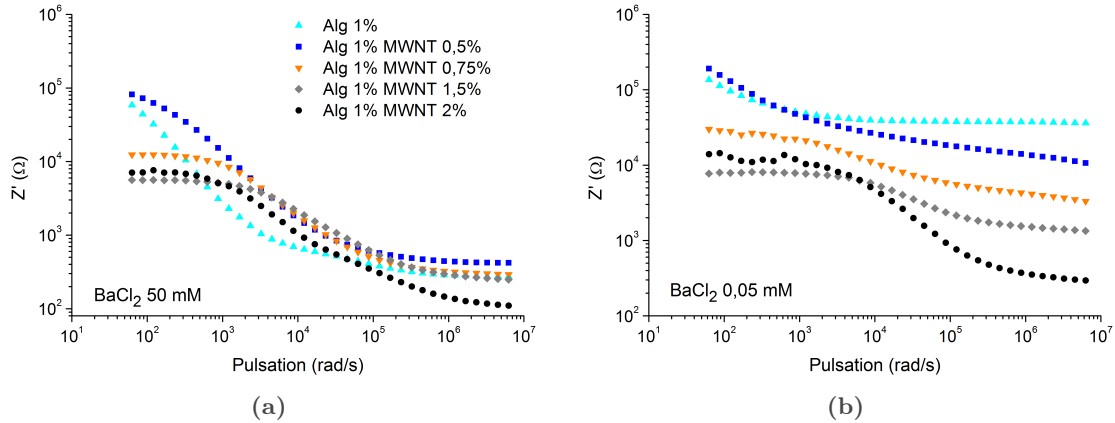


FIGURE II.14 – Tracés de la partie réelle de l'impédance complexe mesurée ($Z'(\omega)$) sur des matériaux contenant différents pourcentages de MWNT à différentes concentrations ioniques.

À haute fréquence, l'évolution de $Z'(\omega)$ est fortement dépendante de la concentration du fond d'ions. À forte concentration ionique, quelque soit le pourcentage de MWNT, la valeur de $Z'(\omega)$ semble être donnée par celle de la bille sans MWNT. À faible concentration ionique, $Z'(\omega)$ est élevée pour la bille sans MWNT. L'ajout de nanotubes fait diminuer fortement la valeur de $Z'(\omega)$.

Aux basses fréquences, la variation du fond d'ions ne semble pas avoir d'influence sur la mesure.

En distinguant la partie ionique et la partie solide de notre système, il est possible de le modéliser simplement afin d'explicitier qualitativement les dépendances fréquentielles observées expérimentalement.

II.3.4 Modèle équivalent du système Alginate/MWNT/fond ionique.

Le système étudié par impédancemétrie peut être séparé en deux réseaux parallèles. D'une part, le fond ionique, dont l'impédance est caractérisée par une conductivité ionique. D'autre part, le réseaux solide composé de l'alginate et des nanotubes dont l'impédance est caractérisée par la conduction électronique des nanotubes.

La figure II.15 propose une modélisation de l'échantillon mesuré. Les résistances R_i et R_b représentent respectivement la résistance ionique du fond d'ions et la résistance de la bille. La capacité C a été introduite pour rendre compte des phénomènes de polarisation aux électrodes qui sont prépondérants à basse fréquence lors de mesures d'impédance dans les milieux ioniques. Parmi d'autres, le modèle alliant une capacité et une résistance en série est le modèle le plus simple étant utilisé pour rendre compte du comportement d'une électrode sous potentiel dans un fond ionique [40]. Il a été proposé par Warburg en 1899 [10].

L'impédance totale de ce circuit est calculable par addition d'impédances en parallèle :

$$Z_{\text{ionique}} = R_i + \frac{1}{jC\omega} \quad (\text{II.10})$$

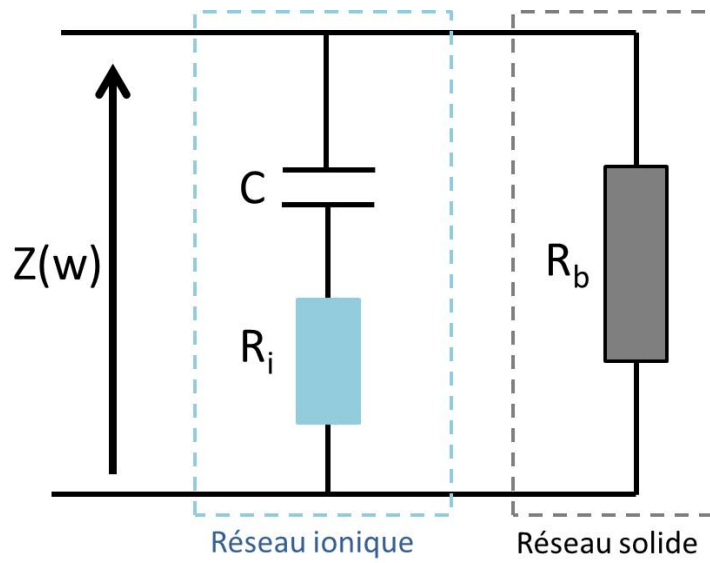


FIGURE II.15 – Schéma électrique équivalent au système Alg/MWNT/fond ionique. R_i : résistance du fond ionique, R_b : résistance de la bille. C est la capacité générée par l'apparition d'une double couche ionique aux électrodes aux basses fréquences.

$$Z_{\text{solide}} = R_b \quad (\text{II.11})$$

$$Z_{\text{eq}} = Z_{\text{ionique}} // Z_{\text{solide}} = \frac{1}{\frac{1}{Z_{\text{ionique}}} + \frac{1}{Z_{\text{solide}}}} \quad (\text{II.12})$$

On obtient alors les expressions des parties imaginaires et des parties réelles :

$$\text{Re}(Z) = R_b \frac{1 + R_i(R_b + R_i)C^2\omega^2}{1 + (R_b + R_i)^2C^2\omega^2} \quad (\text{II.13})$$

et

$$\text{Im}(Z) = -\frac{R_b C \omega}{1 + (R_b + R_i)^2 C^2 \omega^2} \quad (\text{II.14})$$

avec les fréquences caractéristiques suivantes :

$$\omega_1^2 = \frac{1}{(R_b + R_i)^2 C^2} \text{ et } \omega_2^2 = \frac{1}{(R_b + R_i) R_i C^2} \quad (\text{II.15})$$

À valeur de C fixée, et dans la gamme de fréquences considérées, on peut observer trois cas de figure suivant les valeurs relatives des résistances. La figure II.16 présente l'évolution de la partie réelle et de la partie imaginaire de l'impédance dans ces trois cas. Dans le cas

II.3. Caractérisation de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par impédancemétrie

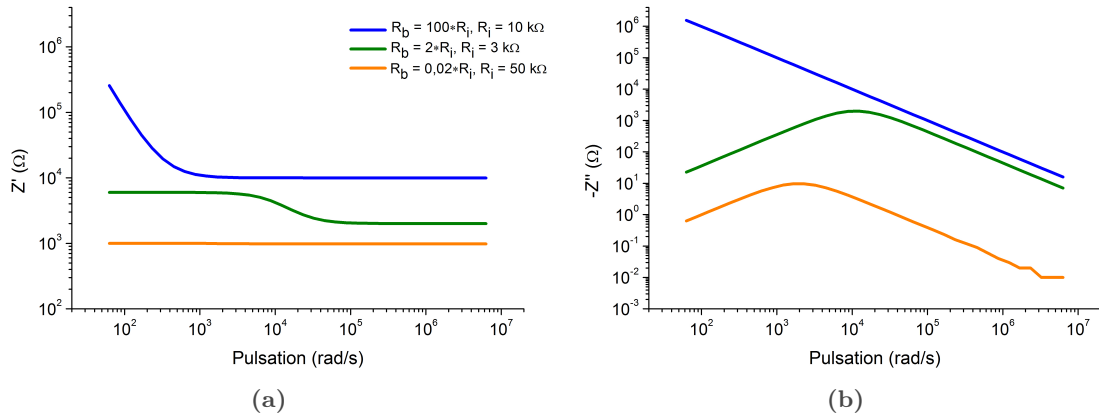


FIGURE II.16 – Tracé de l'impédance du système modèle en fonction de la pulsation dans les trois cas limites : $R_b \gg R_i$, $R_b \simeq R_i$ et $R_b \ll R_i$. C est fixé à 1.10^{-8}F . (a) Partie réelle en fonction de ω . (b) (-1) *Partie imaginaire en fonction de ω .

où $R_b \gg R_i$, le circuit se comporte comme la branche "ionique" du circuit modèle. Lorsque $R_b \ll R_i$, le circuit est équivalent à la branche "solide", il n'y a alors plus de dépendance en fréquence de la partie réelle dans la gamme observée. Enfin un dernier cas est à considérer quand R_b est de l'ordre de R_i . À basse fréquence, le circuit est alors équivalent à la branche "solide". Il évolue ensuite vers un circuit à R_i en parallèle de R_b à mesure que la fréquence augmente.

Il semblerait que notre système se comporte comme le cas $R_b \gg R_i$ pour les faibles pourcentages en MWNT et comme le cas où R_b est de l'ordre de R_i pour les pourcentages supérieurs à 0,75 %. La résistance de la bille semble donc chuter fortement lorsque l'on passe de 0,5 à 0,75 %.

II.3.5 Approximation des courbes réelles par le modèle théorique

Les courbes expérimentales sont ajustées par les formules obtenus à partir du modèle décrit précédemment. Ce traitement a été effectué sur la partie réelle des impédances *via* l'utilisation du logiciel Origin et son menu de simulation pour deux matériaux contenant différents pourcentages en MWNT (voir figure II.17). On obtient donc des valeurs de C , R_i et R_b qui sont ensuite utilisées pour approximer la partie imaginaire de l'impédance. On remarque que les coefficients trouvés avec la partie réelle approximent relativement bien la partie imaginaire. Cependant l'approche n'est plus valable aux hautes fréquences. La différence observée représente une limite du modèle simple utilisé. Il ne prend pas en compte les effets capacitifs dus à l'ajout de MWNT dans la bille. En effet, si le réseau de MWNT n'est pas totalement percolé, les particules conductrices peuvent se comporter comme des micro-condensateurs. Pour prendre en compte ce phénomène, le modèle pourrait être modifié par l'ajout d'un condensateur en parallèle de la résistance R_b . De plus, le modèle ne prend pas en compte les connexions entre l'impédancemètre et la cellule de mesures. Ces connexions induisent des contributions résistives, capacitives et parfois inductives qui peuvent devenir non

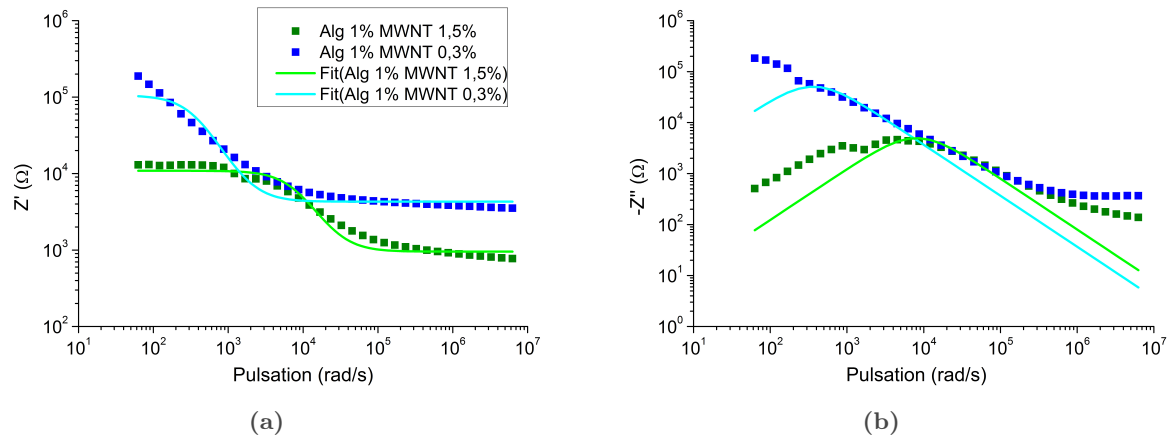


FIGURE II.17 – Tracé de l'impédance complexe mesurée (points) et de l'impédance complexe calculée (ligne). En vert, une bille à 1,5 % de MWNT, en bleu, une bille à 0,3 % de MWNT. Le fond ionique est de 5mM en BaCl₂. (a) Partie réelle en fonction de ω . (b) (-1)*Partie imaginaire en fonction de ω . Le fond ionique est de 5mM en BaCl₂.

négligeables dans certaines gammes de fréquence.

L'ensemble des mesures effectuées aux trois concentrations de fond ionique (0,05 mM, 5 mM et 50 mM) ont été ajustées par le modèle présenté ci-dessus. Les trois graphiques de la figure II.18 représentent l'évolution des paramètres R_b , R_i et C en fonction du fond ionique et du pourcentage de nanotubes.

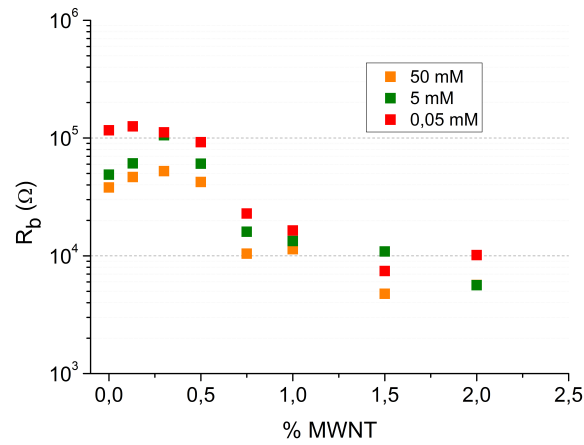
Concernant l'évolution de R_b , sa valeur chute d'un facteur 10 entre 0,5 % et 0,75 %. Ce saut correspond à une percolation du réseau de nanotubes à l'intérieur de la bille. R_b est peu sensible à la modification du fond ionique. Il modélise donc bien la partie solide de notre système. Le réseau percolé de nanotubes à une résistance de l'ordre de 10 k Ω . Compte tenu de la cellule de mesure caractérisée par S , la surface de la bille en contact avec les électrodes de mesures, et L , la distance entre les électrodes, la résistance de la bille, R_b , correspond à la conductivité suivante :

$$\sigma_b = \frac{L}{S * R_b} \tag{II.16}$$

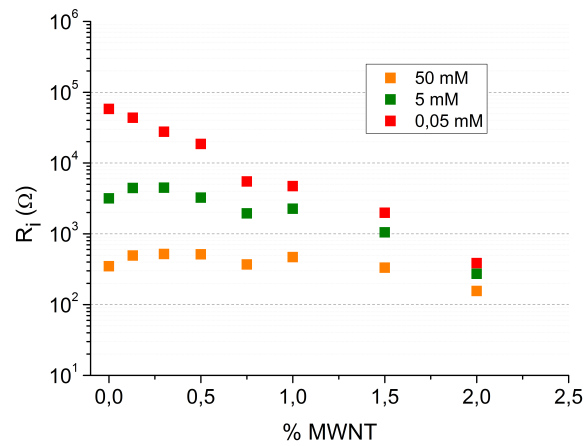
Dans notre cas, on a $S \simeq 4 \text{ mm}^2$ et $L = 3 \text{ mm}$. Le réseau de nanotubes présente donc une conductivité d'environ 0,1 S.m⁻¹. Nous pouvons noter que cette valeur est certainement sous-estimée car le réseau de nanotubes n'est pas connecté parfaitement aux électrodes. Il existe donc très probablement d'importantes résistances de contact qui minimisent la conductivité mesurée.

Comme attendu, la résistance R_i est d'autant plus faible que la concentration en ions est élevée. À concentration ionique constante, on observe une diminution de la résistance R_i avec l'augmentation du pourcentage de MWNT. Cette diminution peut paraître surprenante à première vue. La concentration ionique ne variant pas, la conductivité ionique est donc

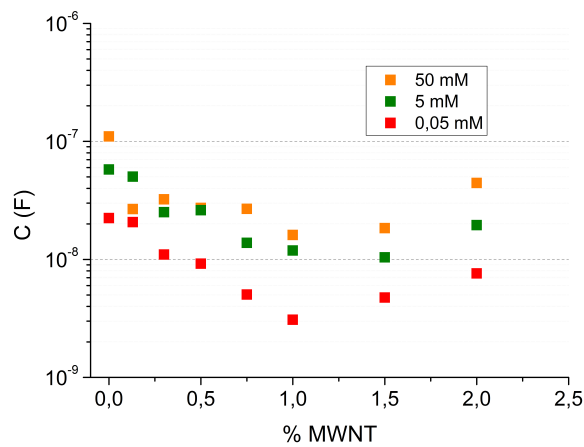
II.3. Caractérisation de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par impédancemétrie



(a) $R_b = f(\%MWNT)$



(b) $R_i = f(\%MWNT)$



(c) $C = f(\%MWNT)$

FIGURE II.18 – Évolution des paramètres d'ajustement en fonction du pourcentage de MWNT à différents fonds ioniques.

constante. Cependant, on mesure ici la résistance ionique. Cette grandeur est généralement reliée à la conductivité ionique σ_i par l'expression :

$$R_i = \frac{1}{\lambda \sigma_i} \quad (\text{II.17})$$

Avec λ une grandeur caractéristique du système liée à la géométrie des électrodes. En l'absence de MWNT, on peut considérer que :

$$\lambda = \frac{S}{L} \quad (\text{II.18})$$

Par ajout de MWNT qui se connectent électriquement aux électrodes, la géométrie effective de mesure se trouve modifiée. Les nanotubes en contact avec l'électrode auront tendance à faire diminuer la distance L et faire augmenter la surface S . Il en résulte une augmentation de λ et donc une diminution de la résistance ionique.

Concernant la valeur de la capacité sans MWNT, on constate qu'elle augmente lorsque la concentration du fond d'ions augmente. La capacité correspond ici aux phénomènes de polarisation aux électrodes de mesure. D'après le modèle de Gouy, Chapman et Stern [8] [94], la capacité entre une électrode et un liquide ionique est la somme de deux capacités parallèles : une capacité en lien avec la double couche, dite de Helmholtz C_H et une capacité liée à la couche de diffusion, dite de Gouy-Chapman C_G :

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} = \frac{d}{\epsilon_0 \epsilon_r} + \frac{\kappa^{-1}}{\epsilon_0 \epsilon_r \cosh\left(\frac{zq\phi_0}{2kT}\right)} \quad (\text{II.19})$$

Avec d l'épaisseur de la double couche, ϵ_0 la permittivité du vide, ϵ_r la permittivité de la double couche, z la charge des ions en solution, ϕ_0 le potentiel appliqué à l'électrode, q la charge d'un électron et κ^{-1} la longueur de Debye.

D'après (II.19), on comprend que l'augmentation de la concentration en ion va faire diminuer κ^{-1} . La capacité totale de l'électrode est donc augmentée.

Enfin, l'évolution de la capacité en fonction du taux de nanotubes est, elle, plus difficile à interpréter. Elle semble diminuer légèrement avec l'ajout de nanotubes. Cette tendance pourrait correspondre à la diminution la polarisation des électrodes par l'ajout de MWNT. Cela pourrait provenir de l'adsorption de nanotubes à la surface des électrodes.

II.3.6 Conductivité des autres hydrogels Alginate/MWNT-Brij

Une mesure d'impédance a été effectuée sur une bille Alg/MWNT-Brij35 n'ayant pas subi l'étape de dialyse du protocole de fabrication des billes. Les résultats obtenus est présentés sur la figure II.19. Les courbes se révèlent similaires à celles obtenues sur une bille ne contenant pas de nanotubes.

Des mesures similaires ont été réalisées sur des billes Alginate/MWNT-Brij58 et Alginate / MWNT- Brij78. Même après l'étape de dialyse, l'impédance de ces billes ne présente pas de différence notable par rapport aux billes d'alginate simples. Leur impédance est similaire à

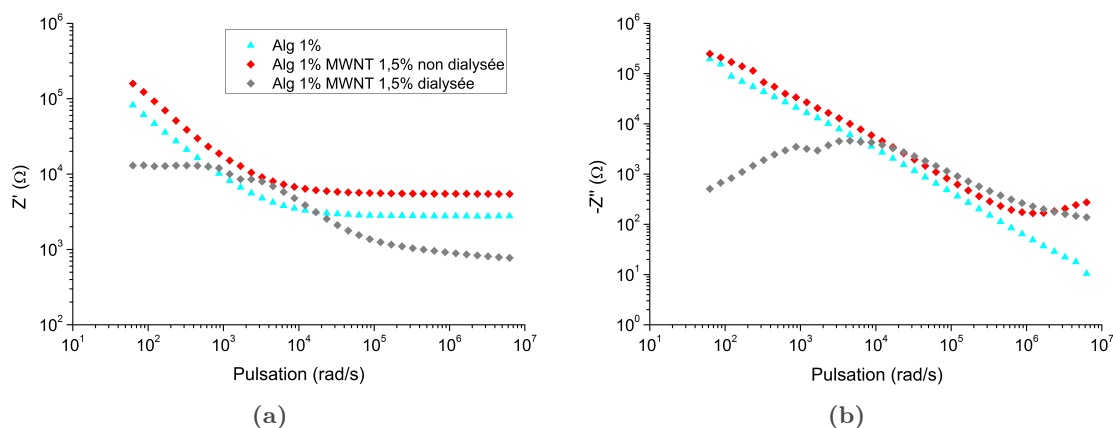


FIGURE II.19 – Comparaison de l'impédance complexe d'une bille Alg/MWNT-Brij dialysée (gris) et non dialysée (rouge). L'impédance d'une bille sans MWNT est représentée comme référence (turquoise). (a) Partie réelle en fonction de ω . (b) (-1) *Partie imaginaire en fonction de ω .

celle mesurée pour une bille Alg/MWNT-Brij35 "non dialysée". Le Brij58 et le Brij78 sont des tensioactifs plus hydrophobes car ils possèdent des chaînes carbonées plus longues que celle du Brij35. Leur adsorption sur les nanotubes est donc plus forte. Ce phénomène pourrait ralentir ou bloquer leur dialyse et empêcher les connexions entre les MWNTs.

Le choix du tensioactif ainsi que l'étape de dialyse semblent donc avoir des rôles prépondérants dans la création d'un réseau conducteur de nanotubes au sein de l'alginate. Cet aspect sera abordé plus en profondeur dans le chapitre suivant.

II.3.7 Conclusion sur la mesure d'impédance

La modification de la conductivité de l'hydrogel par incorporation de nanotubes est complexe. La mesure d'impédance révèle une forte dépendance fréquentielle des signaux obtenus. Cependant nous avons montré que le système peut être modélisé en première approximation comme un circuit électrique simple. Cette approche nous a permis d'expliquer une partie des variations fréquentielles observées. L'étude à basse fréquence du système se révèle être similaire à la mesure de la résistance du réseau solide. Cette considération permet d'estimer la conductivité de l'hydrogel Alg/MWNT percolé à $0,1 \text{ S.m}^{-1}$. Cette valeur est en accord avec des études précédentes sur la conductivité d'hydrogel contenant des nanotubes [82][37] ou du graphite [105].

II.4 Conclusion

Ce chapitre s'est axé sur la formulation, la mise en forme, et la caractérisation d'un hydrogel composite Alginate/Nanotubes de carbones. En partant d'un choix large de molécules amphiphiles pour la dispersion des MWNT, plusieurs observations nous ont permis d'optimiser la formulation et le protocole de fabrication de l'hydrogel Alginate/MWNT. Dans un premier temps, la quantité de tensioactif nécessaire à la dispersion de nanotubes a été ajustée *via* une

Chapitre II. Un hydrogel composite conducteur : formulation et propriétés

mesure du décalage de la CMC par tensiométrie. Cette étude s'avère être importante pour la synthèse d'un matériau biocompatible car elle permet de minimiser la fraction de tensioactif dans la formulation. Des observations microscopiques et des mesures rhéologiques ont mis en évidence la déstabilisation des mélanges Alginate/MWNT utilisant des tensioactifs ioniques. Non compatibles avec notre procédé de mise en forme des capsules, ces mélanges ont été écartés des choix de formulations envisagés. Enfin les mesures d'impédance ont montré qu'il est possible d'obtenir des hydrogels hybrides conducteurs électroniques pour des concentrations en nanotubes supérieures ou égales à 0,75 %. Leur conductivité est de l'ordre de $0,1 \text{ S.m}^{-1}$. Cette étude d'impédancemétrie a également mis en évidence la nécessité de l'étape de dialyse dans la création d'un réseau conducteur de nanotubes. La quantité de MWNT ainsi que la capacité du tensioactif à se désorber de la surface des MWNT jouent donc un rôle important dans la conductivité finale de l'hydrogel.

En résumé, la formulation de notre matériau composite conducteur repose sur deux facteurs importants permettant de résoudre les problèmes énoncés au début de ce chapitre. Le paradoxe entre dispersion et connexion des particules a été résolu par l'utilisation d'un tensioactif capable de se désorber sous dialyse après la mise en forme du matériau. L'utilisation de particules fortement hydrophobes comme les MWNT a permis d'établir de bons contacts électriques à l'intérieur de l'hydrogel et donc la création du réseau conducteur souhaité.

Notre hydrogel composite conducteur électronique doit à terme composer la membrane d'une capsule à cœur liquide contenant des bactéries électroactives. Il sera alors utilisé comme une électrode permettant aux bactéries encapsulées de transférer des électrons hors de la capsule. Il est donc intéressant de caractériser ce matériau comme une électrode. Le chapitre suivant expose l'utilisation de billes d'hydrogel Alginate/MWNT comme des électrodes qui sont le siège de réactions d'oxydo-réduction.

Chapitre III

Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie

Sommaire

III.1 Une électrode à l'échelle macroscopique	64
III.1.1 La mesure électrochimique par voltampérométrie	64
III.1.2 Présentation du dispositif expérimental et exemple d'une voltampérométrie cyclique effectuée <i>via</i> un hydrogel conducteur	70
III.1.3 Dialyse du tensioactif et connexion interne de l'hydrogel	75
III.1.4 Augmentation du courant de pic d'oxydation en fonction du pourcentage MWNT	80
III.2 Étude de l'hydrogel par microscopie électrochimique	82
III.2.1 La microscopie électrochimique (SECM)	83
III.2.2 Approche de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par SECM	86
III.2.3 Imager la conductivité de surface	91
III.3 Conclusion	92

L'objectif principal de cette thèse est la création d'une capsule à membrane d'hydrogel adaptée à la culture de bactéries électroactives. En l'absence d'accepteurs solubles d'électrons, ces bactéries peuvent externaliser des électrons via un transfert à un substrat solide sous potentiel. Dans le chapitre précédent, nous avons présenté la fabrication d'un hydrogel conducteur alginate/nanotubes de carbone. Cet hydrogel est compatible avec le procédé de fabrication des capsules à cœur liquide présenté dans le chapitre I. À terme, la membrane de la capsule sera mise sous potentiel pour permettre aux bactéries encapsulées de transférer des électrons. L'hydrogel sera donc utilisé comme une électrode capable d'accepter et de faire transiter des électrons.

Chapitre III. Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie

Le couple bactérie/électrode peut être modélisé comme un couple donneur/accepteur d'électrons. Il est similaire à un système électrochimique comprenant une espèce oxydo-réductrice (red/ox) et une électrode. Une espèce red/ox est capable de s'oxyder et de se réduire suivant le potentiel chimique de son environnement proche. Lorsqu'une électrode est placée à un potentiel supérieur au potentiel d'oxydation de l'espèce en solution, l'espèce est oxydée et transfère un électron à l'électrode.

Durant ce projet de thèse, une collaboration a été initiée avec l'équipe de Frédéric Kanoufi, Jean-Marc Noël et Catherine Combellas du laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes à l'université Paris Diderot (ITODYS). Leur expertise dans le domaine des processus électrochimiques et de la Microscopie Électrochimique (SECM) nous a permis d'étudier la conductivité de l'hydrogel Alg/MWNT aux échelles macroscopique et microscopique.

Dans ce chapitre, nous proposons donc de caractériser l'hydrogel Alg/MWNT par voie électrochimique. Celui-ci sera utilisé dans un premier temps comme une électrode macroscopique. Nous développerons ensuite une approche originale à l'échelle microscopique pour sonder et imager la conductivité de notre matériau.

Tout au long de ce chapitre, les objets d'études sont des billes Alg/MWNT-Brij35 synthétisées par le protocole exposé dans le paragraphe II.2.4.

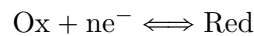
III.1 Une électrode à l'échelle macroscopique

III.1.1 La mesure électrochimique par voltampérométrie

Cette partie expose les bases théoriques de la voltampérométrie. Nous traitons les cas nécessaires à la compréhension de la caractérisation des hydrogels Alg/MWNT par cette technique [17][130][8].

III.1.1.1 La réaction électrochimique

Soit un couple oxydo-réducteur défini par l'équilibre :



Le potentiel d'une solution d'un tel couple red/ox peut être évalué grâce à la loi de Nernst :

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \right) \quad (\text{III.1})$$

avec E^0 le potentiel standard, R la constante des gaz parfaits, T la température en Kelvin, n le nombre d'électrons échangés par le couple red/ox, F la constante de Faraday, et a_{ox} et a_{red} les activités des espèces Ox et Red en solution. Pour des espèces diluées, le rapport des activités est égales au rapport des concentrations (i.e. $a_{\text{ox}}/a_{\text{red}} = C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}$).

III.1. Une électrode à l'échelle macroscopique

Lorsqu'une électrode est introduite dans une solution contenant un couple red/ox solubilisé, elle prend alors le potentiel d'équilibre de la solution. À 25 ° C, il s'exprime comme suit :

$$E_{\text{eq}} = E^0 + \frac{0,058}{n} \ln \left(\frac{C_{\text{ox}}}{C_{\text{red}}} \right) \quad (\text{III.2})$$

En appliquant un potentiel différent de E_{eq} à l'électrode E , il est possible d'induire une réaction électrochimique. Imposer $E \neq E_{\text{eq}}$ contraint le système à évoluer pour établir un nouvel état d'équilibre. Cette évolution dépend du signe de la différence $E - E_{\text{eq}}$:

- Si $E - E_{\text{eq}} > 0$, le rapport $C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}$ augmente afin de faire tendre E_{eq} vers E . L'électrode est alors le siège d'une oxydation. Dans ce cas, elle est appelée anode.
- Si $E - E_{\text{eq}} < 0$, le rapport $C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}$ diminue afin de faire tendre E_{eq} vers E . L'électrode est alors le siège d'une réduction. Dans ce cas, elle est appelée cathode.

La réaction électrochimique peut être décomposée en deux étapes. Une étape de transfert électronique entre les espèces chimiques et une électrode, alimentée par une étape de transfert de masse permettant aux espèces d'arriver à l'électrode. La suite de cette partie expose les paramètres régissant ces deux étapes indispensables à la réaction électrochimique.

III.1.1.2 Le transfert électronique

Lors d'une réaction électrochimique, le courant mesuré est lié au nombre de charges transférées à l'électrode. Il s'exprime comme la somme de la vitesse de transfert de charge de l'oxydation et de la réduction :

$$\frac{I}{nFS} = \frac{j}{nF} = k_a C_{\text{red}}^e - k_c C_{\text{ox}}^e \quad (\text{III.3})$$

avec S l'aire de l'électrode en cm^2 , I le courant mesuré à l'électrode en A, j la densité de courant en A.cm^{-2} , k_a et k_c les constantes de vitesse caractéristiques du processus d'oxydation et de réduction respectivement et C_{red}^e et C_{ox}^e les concentrations en oxydants et réducteurs à la surface de l'électrode.

Il est admis que les constantes de transfert de charges, k_a et k_c , obéissent à la loi d'activation d'Arrhénius en faisant intervenir un coefficient α , le coefficient de transfert de charges. Il est strictement compris entre 0 et 5. Les constantes k_a et k_c s'expriment donc ainsi :

$$k_c = k^0 \exp \left(\frac{-\alpha nF}{RT} (E - E^0) \right) \text{ et } k_a = k^0 \exp \left(\frac{(1 - \alpha)nF}{RT} (E - E^0) \right) \quad (\text{III.4})$$

avec k^0 la constante de vitesse standard d'échange d'électrons.

Chapitre III. Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie

La vitesse de transfert de charge s'exprime alors comme suit :

$$\frac{j}{nF} = k^0 \exp\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E - E^0)\right) C_{\text{red}}^e - k^0 \exp\left(\frac{-\alpha nF}{RT}(E - E^0)\right) C_{\text{ox}}^e \quad (\text{III.5})$$

À l'équilibre $j = 0$, $C_{\text{ox}} = C_{\text{ox}}^{\text{sol}}$ et $C_{\text{red}} = C_{\text{red}}^{\text{sol}}$ avec C^{sol} les concentrations infiniment loin de l'électrode. (III.5) donne la loi de Nernst :

$$\frac{C_{\text{ox}}^{\text{sol}}}{C_{\text{red}}^{\text{sol}}} = \exp\left(\frac{nF}{RT}(E_{\text{eq}} - E^0)\right) \quad (\text{III.6})$$

On peut également définir la densité de courant d'échange à l'équilibre, j_0 :

$$j^0 = nFk^0 C_{\text{ox}}^{\text{sol}} \exp\left(\frac{(-\alpha)nF}{RT}(E_{\text{eq}} - E^0)\right) \quad (\text{III.7})$$

Avec ??, (III.7) devient :

$$j^0 = nFk^0 \left(C_{\text{red}}^{\text{sol}}\right)^\alpha \left(C_{\text{ox}}^{\text{sol}}\right)^{1-\alpha} \quad (\text{III.8})$$

Imposer un surpotentiel $\eta = E - E_{\text{eq}}$ induit une réaction électrochimique. La loi de Nernst permet de relier η à E_0 :

$$\eta = E - E^0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{C_{\text{ox}}^{\text{sol}}}{C_{\text{red}}^{\text{sol}}}\right) \quad (\text{III.9})$$

En introduisant (III.9) dans (III.5), il est possible de faire apparaître la densité de courant à l'équilibre j^0 sous la forme de l'équation (III.8). On obtient alors l'expression de j en fonction du surpotentiel η :

$$j = j^0 \left[\frac{C_{\text{red}}^e}{C_{\text{red}}^{\text{sol}}} \exp\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}\eta\right) - \frac{C_{\text{ox}}^e}{C_{\text{ox}}^{\text{sol}}} \exp\left(\frac{-\alpha nF}{RT}\eta\right) \right] \quad (\text{III.10})$$

Cette relation est appelée relation de Butler-Volmer.

Au niveau de l'électrode, il existe donc une expression qui relie le potentiel appliqué et le courant mesuré. Si les valeurs de α et C^{sol} restent constantes, les concentrations à l'électrode C_{red}^e et C_{ox}^e peuvent varier en fonction du temps. Il faut donc considérer les phénomènes de transport de masse jusqu'à l'électrode.

III.1.1.3 Le transport de masse à l'électrode

Lors d'une réaction électrochimique, des espèces sont consommées et produites localement. Afin de permettre la réaction, l'espèce consommée doit être présente à l'électrode. Dans l'analyse d'une réaction électrochimique, la compréhension des phénomènes de transports d'espèces jusqu'à l'électrode est donc primordiale. De manière générale, trois modes de transport sont considérés :

- La diffusion : elle représente le mouvement des espèces provoqué par un gradient de concentration entre la solution et le voisinage de l'électrode.
- La migration : elle représente le mouvement des espèces chargées généré par le gradient de potentiel appliqué à solution.
- La convection : elle représente le mouvement des espèces induit par des forces mécaniques comme de l'agitation.

Dans notre étude, seule la diffusion sera prise en compte. Les phénomènes de migration peuvent être négligés car les expériences sont menées en présence d'un large excès d'électrolyte. La convection est négligée également car les mesures électrochimiques sont effectuées sans agitation.

Dans le cadre d'une diffusion naturelle, les concentrations des espèces C_{red}^e et C_{ox}^e à l'électrode peuvent être obtenues par intégration des équations de Fick :

— **La première équation de Fick**

La première loi de Fick énonce que le flux de particules à travers une surface est proportionnel au gradient de concentration. En régime permanent et à une dimension, elle s'exprime comme suit :

$$\phi = -D \text{grad}(C) = -D \frac{\partial C(x)}{\partial x} \quad (\text{III.11})$$

avec D le coefficient de diffusion de l'espèce et ϕ le flux de l'espèce à la concentration c . En considérant une réaction électrochimique sur une surface donnée, la conservation des masses et la production d'électrons donnent la relation suivante :

$$-D_{\text{ox}} \left(\frac{\partial C_{\text{ox}}^e}{\partial x} \right)_{\text{elec}} = D_{\text{red}} \left(\frac{\partial C_{\text{red}}^e}{\partial x} \right)_{\text{elec}} = \frac{j}{nF} \quad (\text{III.12})$$

— **La seconde équation de Fick**

Elle relie la variation temporelle et la variation spatiale des concentrations. Par un bilan de matière entre le temps t et \hat{t} dans un volume unité, l'utilisation de (III.11)

Chapitre III. Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie

permet l'obtention de la seconde équation de Fick. À une dimension, son expression est la suivante :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{III.13})$$

L'intégration de cette équation différentielle nécessite la connaissance de conditions limites. En général, les conditions connues sont les concentrations à $t = 0$ et les concentrations à tout instant t , loin de l'électrode ($x = \infty$) et à l'électrode par la loi de Butler-Volmer. La seconde équation de Fick peut être résolue en utilisant la transformation de Laplace.

Dans le cas d'une diffusion, l'application d'un surpotentiel consomme les espèces à proximité de l'électrode. Il s'établit alors une couche de diffusion dans laquelle les concentrations diffèrent de celles de la solution. Pour une oxydation générée par un potentiel suffisamment élevé, $c_{red} = 0$ à l'électrode. $j = f(t)$ s'exprime alors simplement :

$$j(t) = \frac{nFD_{red}C_{red}^{sol}}{\sqrt{\pi D_{red}t}} \quad (\text{Loi de Cottrell}) \quad (\text{III.14})$$

Le terme $\sqrt{\pi D_{red}t}$ correspond à l'épaisseur de la couche de diffusion des espèces consommées.

III.1.1.4 La voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie consiste en la mesure du courant lors de l'application d'un potentiel variable à une électrode en solution. La variation du potentiel est généralement linéaire :

$$E(t) = E_i + vt$$

avec v la vitesse de balayage en potentiel (V.s^{-1}).

En régime de diffusion pure, l'intégration des équations de Fick permet de connaître la concentration des espèces à l'électrode de mesure. L'application de la loi de Butler-Volmer permet alors l'obtention de l'expression de $j = f(t)$. Expérimentalement, une mesure de voltampérométrie est représentée par une courbe $I = f(E)$

L'étude électrochimique de l'hydrogel composite est effectuée par voltampérométrie cyclique (CV). Cette technique est basée sur l'enchaînement d'un balayage "retour" à la suite du premier balayage de voltampérométrie. L'expérimentateur choisit les limites du potentiel (E_{min} et E_{max}) et la vitesse de balayage ($v = dE/dt$). À titre d'exemple, la figure III.1 représente une voltampérométrie cyclique effectuée en présence d'une espèce red/ox en solution sous sa forme réduite. L'expérience a été réalisée en configuration de diffusion pure, c'est-à-dire sans agitation, entre -0,1 V et 0,4 V, à 10 mV.s^{-1} .

On observe une augmentation du courant de 0 V à 0,2 V et l'apparition d'un pic de courant appelé pic d'oxydation. Cette augmentation correspond à l'accélération du processus d'oxydation de l'espèce au niveau de l'électrode. Sur le retour du cycle, un pic négatif témoigne de la réduction de l'espèce oxydée dans la première partie du cycle. Suivant la forme du

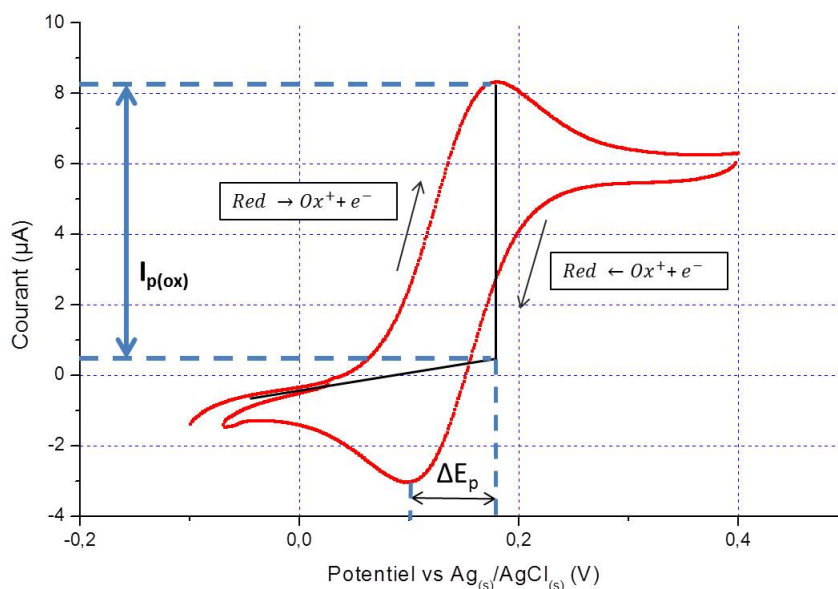


FIGURE III.1 – Voltampérométrie cyclique réalisée dans une solution de ferrocène méthanol sous sa forme réduite à 1 mmol.L^{-1} à $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ par un fil de platine de $250 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et 15 mm de long. Pour chaque CV, on peut généralement obtenir, $I_{p(\text{ox})}$, le courant de pic d'oxydation, et ΔE_p la différence de potentiel entre le pic d'oxydation et le pic de réduction.

voltampérogramme, on peut obtenir trois grandeurs qui nous informent sur les caractéristiques de l'électrode utilisée (voir figure III.1) :

- $I_{p(\text{ox})}$, le courant de pic d'oxydation.

Il représente le courant maximum mesuré. Il est déterminé graphiquement à l'aide de la tangente à la courbe en $E = 0 \text{ V}$ et la hauteur issue de pic d'oxydation (voir figure III.1). Il est relié à l'aire efficace de l'électrode. Dans le cas d'une électrode plane, il permet d'évaluer précisément cette aire *via* la relation de Randles-Sevcik [145] :

$$I_{p(\text{ox})} = 0,4463 n F S C \left(\frac{n F v D}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{III.15})$$

avec $I_{p(\text{ox})}$ exprimé en A, n le nombre d'électrons échangés dans la réaction d'oxydo-réduction, S l'aire de l'électrode en cm^2 , C la concentration en mol.m^{-3} , v la vitesse de balayage en V.s^{-1} , D le coefficient de diffusion de l'espèce red/ox en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$, R la constante des gaz parfaits et T la température en K.

La relation de Randles-Sevcik est obtenue par intégration de la seconde équation de Fick et application de la loi de Butler-Volmer dans le cas d'un système rapide en diffusion naturelle. Dans une expérience de voltampérométrie cyclique la charge extraite de la solution est indépendante de la vitesse. Cependant le courant représente une charge par unité de temps. Lorsque la vitesse de balayage augmente, le nombre de charge extraite par unité de temps augmente. Par conséquent le courant augmente. Expérimentalement l'évolution linéaire de $I_{p(\text{ox})}$ en fonction de $v^{1/2}$ témoigne du caractère diffusif de la

réaction à l'électrode.

Au delà de $I_{p(ox)}$, les espèces présentes à proximité de l'électrode ont été majoritairement consommées. On observe alors une diminution du courant. Cette décroissance est due au ralentissement de l'oxydation lorsque les phénomènes de transports des espèces deviennent prépondérants.

- ΔE_p , la différence de potentiel entre le pic d'oxydation et le pic de réduction.

Il reflète la limitation cinétique au transfert de charges. Si le transfert de charge est rapide, la théorie prévoit une valeur de ΔE_p égale à $0,06 V$ à $25^\circ C$, et des valeurs plus grandes lorsque le transfert d'électrons est limitant [17]. Il peut aussi refléter une limitation liée à la chute ohmique du système, c'est-à-dire la résistance de l'électrolyte ou de l'électrode.

Dans le cadre de l'exemple de la figure III.1, $I_{p(ox)}$ vaut $7,7 \mu A$. À partir de cette valeur, la relation de Randles-Sevcik donne une estimation de la surface active de l'électrode. En considérant la valeur du coefficient de diffusion du ferrocène méthanol dans l'eau ($7,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), la surface active de l'électrode est de $9,5 \text{ mm}^2$. ΔE_p vaut $0,08 V$, on retrouve ici une valeur proche du cas idéal ($0,06 V$)

Pour étudier l'hydrogel Alginate/MWNT-tensioactif, nous l'utilisons comme une électrode macroscopique dans une solution d'espèces red/ox. La suite de ce chapitre présente le dispositif expérimental permettant la connexion d'un hydrogel ainsi que l'analyse de mesures de voltampérométrie cyclique obtenues avec cette électrode d'hydrogel conducteur.

III.1.2 Présentation du dispositif expérimental et exemple d'une voltampérométrie cyclique effectuée *via* un hydrogel conducteur

III.1.2.1 Un système à trois électrodes

Le dispositif utilisé pour connecter les billes d'hydrogel est schématisé sur la figure III.2(a). Un fil de platine de $250 \mu m$ de diamètre est planté dans une bille Alg/MWNT. L'ensemble est ensuite plongé dans une solution contenant une substance red/ox. La taille d'une espèce red/ox est typiquement inférieure au nanomètre. Cette espèce peut donc diffuser dans l'hydrogel dont la porosité est de 20 nm . Les transferts d'électrons s'effectuent alors par deux voies différentes : par un transfert direct à l'électrode, ou par un transfert au réseau conducteur de nanotubes connectés. La deuxième voie est accessible uniquement pour les domaines de l'hydrogel reliés électriquement au fil de platine.

Le système complet de mesure est composé de trois électrodes représentées sur la figure III.2(b). Il comporte :

- *Une électrode de travail*

Cette électrode est utilisée pour connecter les billes d'hydrogel composite conducteur. Dans notre étude, elle est constituée d'un fil de platine de la marque *Goodfellow* de diamètre $250 \mu m$ et de pureté $99,99 \%$.

- *Une électrode de référence*

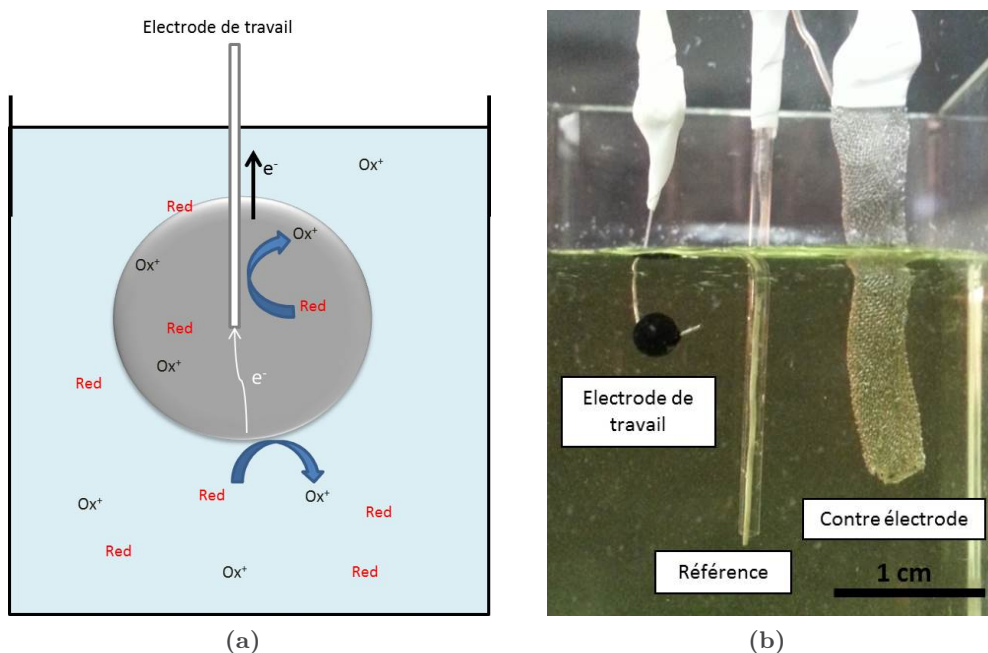


FIGURE III.2 – Schéma (a) et photo (b) du système d'électrodes permettant la connexion et l'étude de l'hydrogel Alg/MWNT comme une électrode macroscopique. Le système comprend : une électrode de travail en Pt (avec une bille connectée), une référence en $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$ et une contre électrode en grille de Pt.

Le potentiel appliqué à l'électrode de travail est toujours pris par rapport à une électrode de référence qui possède un potentiel fixe. Nous utilisons une électrode au chlorure d'argent ($\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$). Elle est composée d'un fil d'argent recouvert d'un précipité de chlorure d'argent.

— *Une contre-électrode*

La contre-électrode permet le retour des charges dans la solution. Sa surface est choisie largement supérieure à celle de l'électrode de travail. Nous utilisons une grille de platine *Goodfellow* composée de fils de platine de $60 \mu\text{m}$ avec une surface ouverte de 65 %. Sa surface est de l'ordre de 5 cm^2 .

Ces trois électrodes sont reliées à un potentiostat *CH Instruments 62A03* contrôlant la différence de potentiel entre l'électrode de travail et celle de référence. Il mesure également le courant qui passe entre l'électrode de travail et la contre-électrode.

III.1.2.2 Le ferrocène méthanol

Le ferrocène méthanol est l'espèce red/ox utilisée dans notre étude électrochimique (figure III.3).

Le ferrocène méthanol (FcMeOH) est un organo-métallique ayant une structure de type "sandwich". Un ion FeII/FeIII est localisé entre deux cycles cyclopentadiényle. La fonction alcool d'un des cycles confère à l'espèce une bonne solubilité dans l'eau. Le coefficient de diffusion du FcMeOH dans l'eau est de $7,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Par mesures électrochimiques, il est

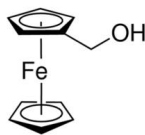


FIGURE III.3 – Structure du ferrocène méthanol, $C_{11}H_{11}FeO$.

possible de mesurer le coefficient de diffusion du FcMeOH dans l'hydrogel d'alginate. Cette étude est présentée en Annexe A. Le coefficient de diffusion du FcMeOH dans un gel d'alginate à 2 % est de $3.10^{-6} \text{ cm}^2.s^{-1}$. Sa diffusion dans l'hydrogel semble être légèrement gênée. Cette étude permet également l'obtention du coefficient de partition du FcMeOH entre l'hydrogel et l'eau. Dans une solution de KCl à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, le rapport des concentrations, $C_{\text{Alginate}}/C_{\text{H}_2\text{O}}$ vaut 1,6.

La solution utilisée pour les mesures électrochimiques est composée de 1 mmol.L^{-1} de FcMeOH, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl comme fond ionique et 1 mmol.L^{-1} de BaCl_2 pour assurer la stabilité des hydrogels. Le couple FcMeOH(II)/FcMeOH(III) possède un potentiel standard E^0 égal à $0,154 \text{ V}$.

Dans la suite de ce chapitre, toutes les billes étudiées sont équilibrées dans la solution de mesure pendant 30 minutes sous agitation orbitale avant d'être utilisées comme électrode.

III.1.2.3 Une mesure voltampérométrique sur une bille Alginate/MWNT

Une bille alginate 1%/MWNT 1,5% est connectée au fil de platine du système de 3 électrodes présenté précédemment. Une mesure de voltampérométrie cyclique est effectuée avec une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} entre $-0,1 \text{ V}$ et $0,5 \text{ V}$ par rapport à $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$. On obtient alors le voltampérogramme présenté en figure III.4.

En partant de $-0,3 \text{ V}$, le potentiel augmente jusqu'à $0,6 \text{ V}$. On constate une augmentation forte du courant à partir de 0 V . Cette augmentation témoigne de l'oxydation du FcMeOH en solution. Ici, $I_{\text{p(ox)}}$ vaut $2,8.10^{-4} \text{ A}$. Il est bien supérieur au courant mesuré sans bille ($\approx 7.10^{-6} \text{ A}$). Au delà du pic d'oxydation, on constate une forte chute du courant. Cette diminution diffère de celle observée précédemment dans le cas d'un courant de transport. Pendant la décroissance du potentiel, on observe un pic de réduction similaire au pic d'oxydation. Le ΔE_p de la CV est de $0,3 \text{ V}$. Cette valeur est bien supérieure à la valeur de $0,06 \text{ V}$ prévue pour une électrode en diffusion pure.

Il est possible d'expliciter les différences constatées entre la voltampérométrie modèle de la figure III.1 et celle de l'hydrogel Alg/MWNT présentée ci-dessus.

Dans cette exemple, l'oxydation s'effectue soit directement sur le fil de platine, soit *via* le réseau de nanotubes inter-connectés au sein de l'alginate (figure III.2(a)). L'ajout de la bille fait augmenter le courant de pic d'oxydation de deux ordres de grandeurs. La bille connectée augmente donc considérablement l'aire effective de l'électrode de travail. On peut affirmer que le réseau de nanotubes est le support principal de l'oxydation du FcMeOH. Il est ici difficile d'estimer une surface effective d'électrode, car la bille Alg/MWNT constitue une électrode

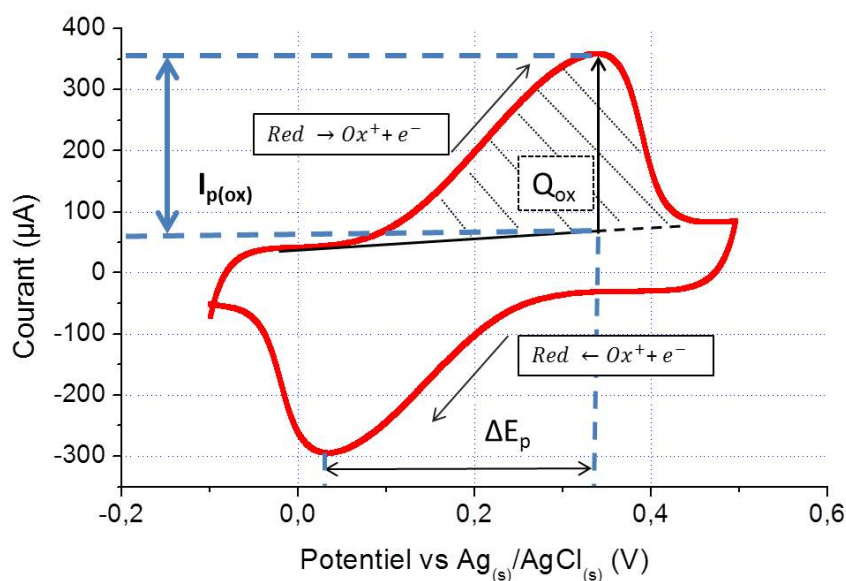


FIGURE III.4 – Voltampérométrie cyclique effectué avec une bille Alg 1%/MWNT 1,5% connectée. Ce type de CV permet l'obtention de : $I_{p(ox)}$, le courant de pic d'oxydation, Q_{ox} la charge totale issue de l'oxydation, et ΔE_p la différence de potentiel entre le pic d'oxydation et le pic de réduction. Les flèche indiquent le sens de balayage du potentiel.

poreuse. La relation de Randles-Sevcik (III.15) ne peut donc pas s'appliquer.

La chute forte du courant au delà du pic d'oxydation peut être expliquée par le calcul de : Q_{ox} , la charge totale issue de l'oxydation, en Coulomb (C).

Elle représente la quantité totale d'électrons extraits de la solution au court de la rampe de potentiel. Elle est liée au nombre de molécules oxydées pendant un cycle. Géométriquement, elle est égale à l'aire sous le pic d'oxydation. Dans cet exemple, une mesure de l'aire du pic d'oxydation donne $Q_{ox} = 3,5 \cdot 10^{-3}$ C. On peut donc estimer le nombre de moles de FcMeOH oxydées durant l'oxydation, $n(FcMeOH)_{ox}$:

$$n(FcMeOH)_{ox} = n(e^{-}) = \frac{Q_{ox}}{F}$$

On obtient alors $n(FcMeOH)_{ox} = 3,6 \cdot 10^{-8}$ mol . On peut également estimer la quantité de FcMeOH présente dans la bille au début du cycle de voltampérométrie. Le rayon de la bille est égal à 1,75 mm. Son volume vaut donc 22 μ L. Les billes sont équilibrées dans une solution à 1 mmol.L⁻¹ en FcMeOH. D'après le coefficient de partition du FcMeOH entre l'hydrogel et l'eau. La concentration de FcMeOH dans l'hydrogel est d'environ 1,6 mmol.L⁻¹. Il y a donc 3,5.10⁻⁸ mole de FcMeOH dans la bille au début du cycle. On peut donc affirmer que la totalité des espèces présentes dans la bille sont oxydées durant le cycle.

Ce calcul explique l'allure de la courbe de voltampérométrie au delà du pic d'oxydation. L'électrode poreuse que constitue la bille permet d'oxyder le FcMeOH sur la totalité de son volume. Á la fin de ce pic d'oxydation, les espèces oxydables ne peuvent arriver que par diffusion depuis l'extérieur de la bille. On passe donc d'une configuration utilisant une électrode volumique (la bille poreuse) à une électrode surfacique (la surface extérieure de la

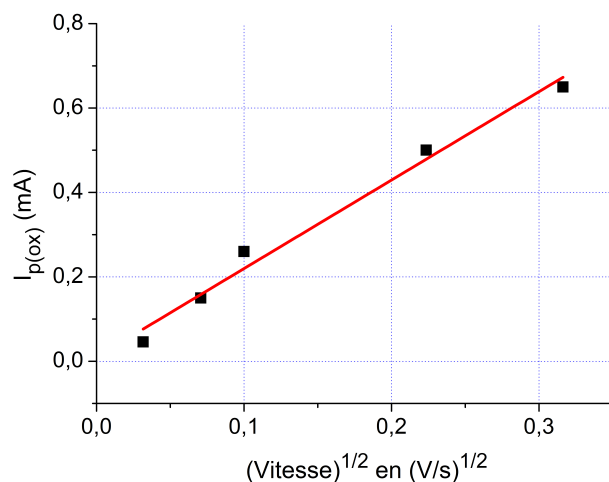


FIGURE III.5 – Évolution de $I_{p(ox)}$ en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel $V^{1/2}$. La ligne pleine représente l'ajustement linéaire entre $I_{p(ox)}$ et $V^{1/2}$.

bille) d'environ 40 mm^2 . Cette surface est du même ordre de grandeur que celle du fil de platine seul. Il est donc normal d'observer une décroissance importante du courant d'oxydation.

Enfin, la valeur de ΔE_p (0,3 V) est très supérieure à la valeur prévue dans le cas d'une électrode parfaitement conductrice. Cette différence nous indique que l'hydrogel possède une résistivité importante. La voltampérométrie est une technique dynamique. Une vitesse de balayage élevée est équivalente à un débit de charges élevé. Dans un matériau résistif ce débit est limité. Il est donc nécessaire d'imposer une surtension pour observer l'oxydation au sein de l'hydrogel. Pour éviter ce phénomène, il faut diminuer la vitesse de balayage. Expérimentalement, en diminuant la vitesse, nous avons constaté une diminution de ΔE_p (non présenté ici).

La figure III.5 représente la variation de $I_{p(ox)}$ en fonction de la vitesse de balayage du potentiel. Comme prévu dans la relation de Randles-Sevcik (III.15), le courant varie linéairement en fonction de la racine carrée de la vitesse. Cette variation nous indique que les réactions d'oxydo-réduction ayant lieu durant la CV sont contrôlées par la diffusion des espèces.

Afin d'évaluer la variabilité des mesures de voltampérométrie cyclique, des CV ont été effectuées sur 10 billes issues d'une même fabrication. La détermination de la valeur de $I_{p(ox)}$ possède un écart type de 8 %. Dans la suite, l'écart-type sur les valeurs de $I_{p(ox)}$ sera toujours considéré comme étant égal à 8 %.

Cet exemple montre que l'électrochimie est adaptée à la caractérisation macroscopique de notre matériau. Elle permet notamment l'observation de phénomènes de partage et de transport ainsi que la mesure de grandeurs en lien avec la porosité, la surface active et la résistance de l'hydrogel conducteur. Ces avantages sont donc mis à profit dans quelques illustrations présentées ci-dessous.

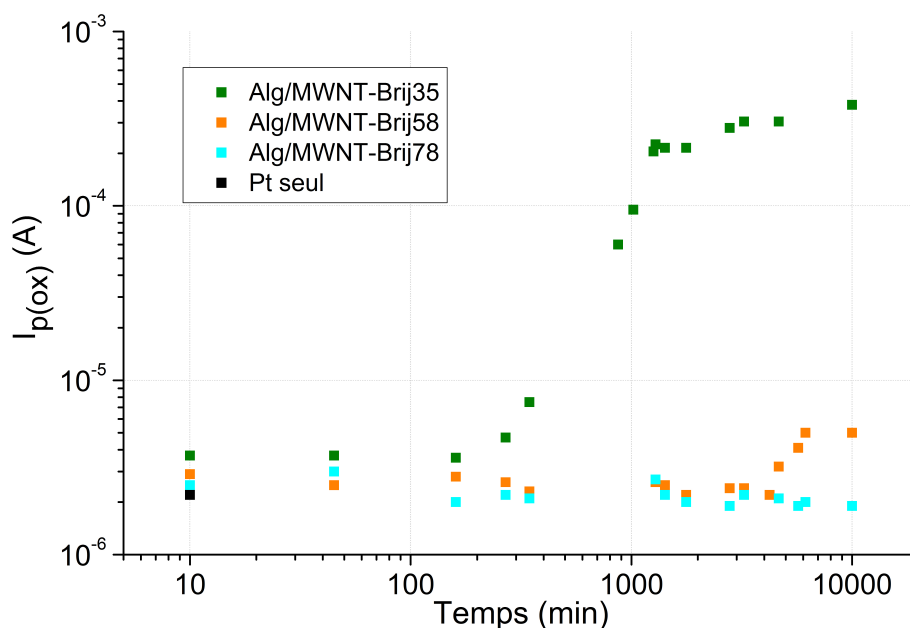


FIGURE III.6 – Évolution du courant de pic d'oxydation en fonction du temps de dialyse des billes Alg/MWNT-tensioactif. Le point noir à $t = 10$ minutes représente le courant obtenu pour le fil de platine seul sans bille connectée. Les trois courbes correspondent aux trois tensioactifs différents utilisés dans la formulation.

III.1.3 Dialyse du tensioactif et connexion interne de l'hydrogel

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'étape de dialyse et le choix du tensioactif sont primordiaux pour la création d'un réseau conducteur au sein de l'hydrogel. On se propose ici de suivre l'état de ce réseau conducteur en fonction du temps de dialyse et du tensioactif utilisé. Pour cela, on considère trois types de billes Agl/MWNT-tensioactif utilisant trois tensioactifs différents : le Brij35, le Brij58 et le Brij78. Les billes sont fabriquées *via* le protocole présenté dans le paragraphe II.2.4. Elles sont dialysées dans un volume d'eau milliQ (+ 1mM BaCl₂) 1000 fois supérieur à leur volume. Pendant la dialyse, des billes sont prélevées régulièrement et équilibrées pendant 30 minutes dans la solution de FcMeOH à 1 mmol.L⁻¹. Elles sont ensuite connectées à un fil de platine puis analysées par voltampérométrie cyclique à 10 mV.s⁻¹. L'évolution du courant maximum d'oxydation ainsi que la forme des voltampérogrammes nous donnent des informations sur la création du réseau conducteur.

III.1.3.1 Évolution du courant de pic d'oxydation

Le courant de pic d'oxydation des billes connectées est mesuré en fonction de leur temps de dialyse. Les résultats sont reportés sur la figure III.6.

Au début de la dialyse, on constate que le courant de pic d'oxydation obtenu est du même ordre de grandeur pour toutes les formulations. Il est également comparable au courant obtenu lors de l'utilisation du fil de platine seul comme électrode de travail. La différence entre ces

Chapitre III. Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie

valeurs est liée à la légère variation de la longueur du fil immergé dans la solution de ferrocène méthanol. Pour toutes les formulations, le courant observé provient donc de l'oxydation de l'espèce red/ox au niveau du fil de platine.

À partir de 200 minutes de dialyse, le courant de pic d'oxydation augmente considérablement pour les billes contenant le Brij35 comme tensioactif. Il reste globalement constant pour les autres formulations. Les nanotubes de carbones contenus dans les billes Alginate/MWNT-Brij35 semblent donc se connecter augmentant l'aire de l'électrode [fil de Pt + bille]. La croissance du courant ralentit au delà de 2000 minutes.

D'après la figure III.6, on peut estimer que la percolation du réseau de nanotubes s'effectue entre 200 et 2000 minutes de dialyse. Nous avons émis l'hypothèse que la désorption du Brij35 de la surface des nanotubes permet des connexions électriques entre les MWNT. Si c'est le cas, la percolation du système doit être reliée à la fuite du tensioactif hors de la bille par diffusion. Il est possible d'estimer l'ordre de grandeur du temps de diffusion t_{diff} d'une molécule de Brij35 du centre de la bille jusqu'à l'extérieur de celle-ci sur la distance d'un rayon R_{bille} :

$$t_{\text{diff}} = \frac{R_{\text{bille}}^2}{D_{\text{Brij35}}} \quad (\text{III.16})$$

avec D_{Brij35} le coefficient de diffusion du Brij35 dans l'hydrogel.

Le coefficient de diffusion du Brij35 peut être évalué à partir de la relation de Stokes Einstein :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{III.17})$$

avec k_b la constante de Boltzmann, T la température en K, η la viscosité de l'eau et R_h le rayon hydrodynamique de la molécule considérée.

Considérons une molécule de Brij35 seule en solution aqueuse, on estime que son rayon hydrodynamique est équivalent au rayon hydrodynamique de sa chaîne hydrophile, un oxyde de polyéthylène de masse molaire 1029 g.mol^{-1} . D'après Armstrong et al. [4], celui-ci vaut 0,9 nm.

Le calcul donne :

$$D_{\text{Brij35}} = 2,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \text{ et } t_{\text{diff}} \simeq 200 \text{ min}$$

En utilisant la valeur de D_{Brij35} , il est possible de calculer le temps exact de diffusion du Brij35 sur une distance équivalente au rayon de la bille R . On considère pour cela une bille contenant une concentration C_0 de Brij 35, plongée à $t = 0$ dans un réservoir homogénéisé. Pour connaître l'évolution de la concentration en Brij 35 dans le volume homogénéisé (C_{ext}), il faut résoudre l'équation de diffusion en coordonnées sphériques :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(D r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (\text{III.18})$$

avec les conditions initiales suivantes :

$$\text{— À } t = 0, 0 \leq r \leq R, C = C_0$$

— À $t = 0$, $C_{\text{ext}} = 0$

La solution de ce problème a été calculée par Crank en 1975 [27]. Elle s'exprime comme suit :

$$C_{\text{ext}}(t) = \frac{1 - A(t)}{1 + \alpha} \quad (\text{III.19})$$

avec α le rapport entre le volume du réservoir homogénéisé et le volume de la bille et $A(t)$ une somme infinie [139][27].

Le calcul numérique de cette solution avec $\alpha = 1000$, nous indique que l'équilibre des concentrations entre la bille et le réservoir est atteint au bout de 60 minutes.

On trouve ici un temps environ 30 fois moins grand que le temps final de connexion du réseau de nanotubes. Cette différence n'est pas surprenante. En effet, le Brij35 étant un tensioactif, il peut interagir avec les MWNT hydrophobes pour qui il a une affinité. Sa diffusion à travers l'hydrogel composite est donc ralentie. Plutôt qu'une diffusion pure, le parcours d'une molécule de Brij est certainement une succession d'adsorptions et de désorptions à la surface des nanotubes.

On remarque que le courant de la formulation utilisant le Brij58 augmente très légèrement à partir de 4000 minutes. Cette augmentation témoigne peut-être du début de connexion des nanotubes. Ce temps plus long pourrait être lié au caractère plus hydrophobe du Brij58 par rapport au Brij35. La désorption du Brij58 est donc plus lente. Le Brij78, encore plus hydrophobe ne se semble pas se désorber.

III.1.3.2 Évolution des voltampérogrammes durant la dialyse

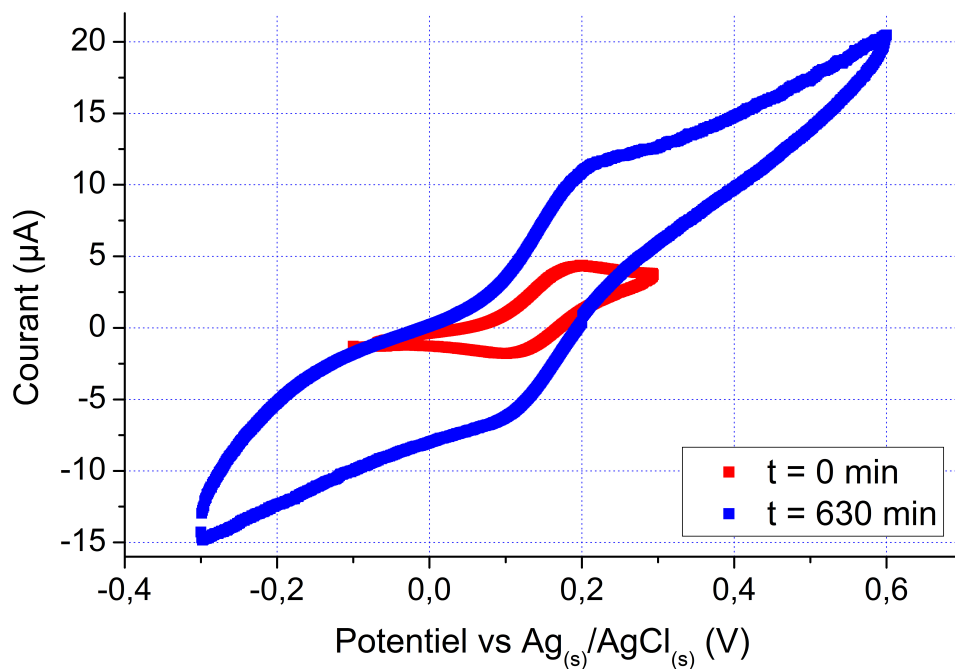
Durant la dialyse du Brij35, la forme des cycles de voltampérométrie évolue. L'analyse qualitative et quantitative de cette évolution nous renseigne sur l'état du réseau conducteur au sein de la bille Alg/MWNT. Les voltampérogrammes présentés dans les figures III.7(a) et III.7(b) illustrent la transformation du réseau.

Avant la connexion globale du réseau conducteur

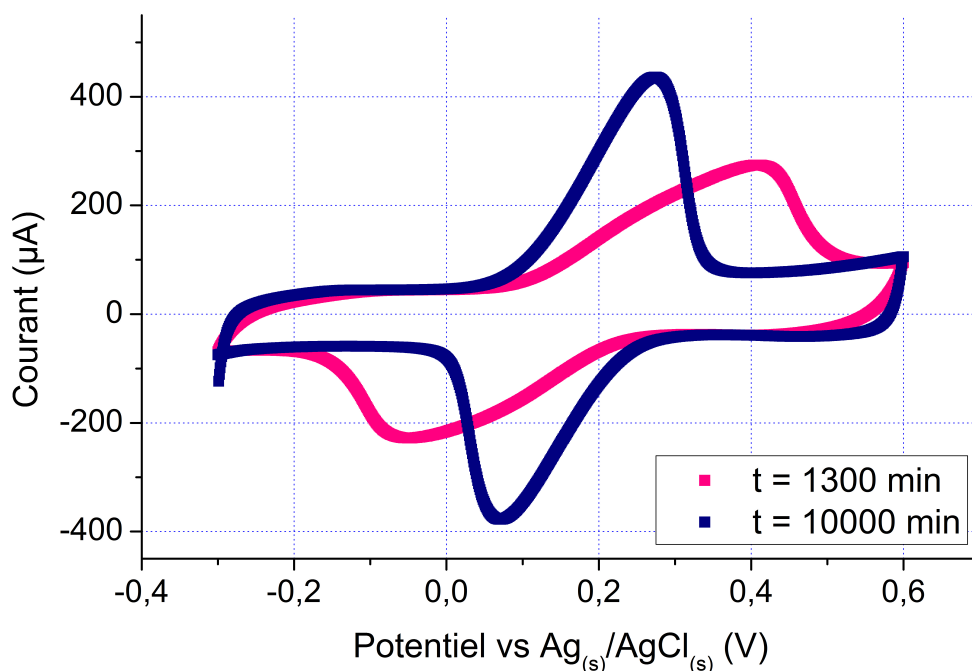
Des CV effectuées au début de la dialyse et avant la connexion macroscopique du réseau de nanotubes sont présentées dans la figure III.7(a). À $t = 0$ minute, la CV du système [fil + bille] a une forme similaire à la CV obtenue pour un fil de platine simple (voir figure III.1). La dialyse n'a pas débuté, les MWNTs sont dispersés et non connectés. Après 630 minutes, la forme de la CV a changé. Cette déformation peut être interprétée comme le début de la connexion des nanotubes au niveau du fil de platine.

Après la connexion globale du réseau conducteur

Des CV effectuées après la connexion macroscopique du réseau de nanotubes sont présentées dans la figure III.7(b). On observe dès 1300 minutes une vague d'oxydation importante qui diminue lorsque la totalité des espèces présentes dans la bille ont été oxydées. Le même type de CV est obtenu au bout de 10000 minutes. Cependant, $I_{\text{p(ox)}}$ augmente et ΔE_p diminue entre 1300 et 10000 minutes. Après la connexion macroscopique des nanotubes, on observe donc un



(a)



(b)

FIGURE III.7 – Évolution des voltampérométries obtenues par l'utilisation d'une bille Alg/MWNT-Brij35 connectée par un fil de platine en fonction du temps de dialyse : 0 et 630 minutes (a), 1300 et 10000 minutes (b). Les mesures sont réalisées dans une solution de FcMeOH à 1 mmol.L^{-1} . Vitesse de balayage : 10 mV.s^{-1} .

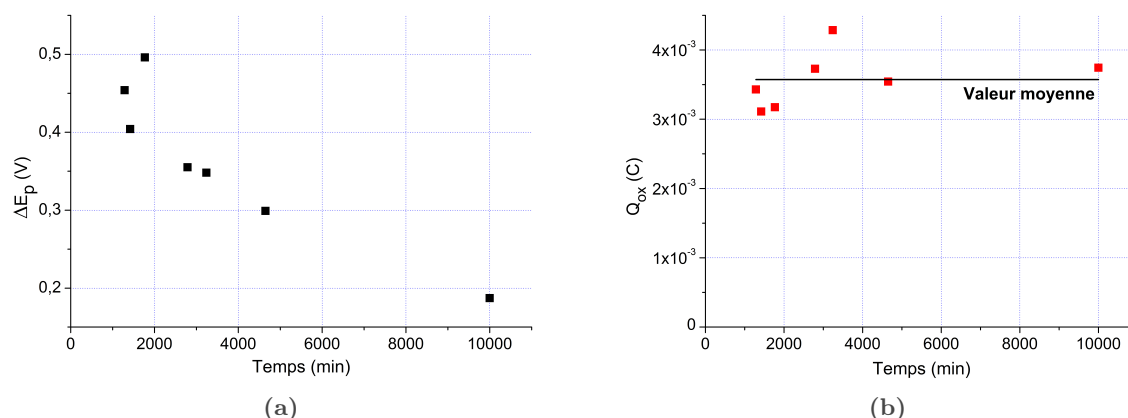


FIGURE III.8 – Évolution des grandeurs ΔE_p (a) et Q_{ox} (b) de CV effectuées avec un bille Alg 1%/MWNT 1,5%-Brij35 connectée par un fil de platine en fonction du temps de dialyse après la connexion globale du réseau conducteur.

murissement du réseau durant lequel de nouvelles connexions entre les MWNT se créent. Elles entraînent la diminution de la résistance de l'hydrogel et donc la diminution de ΔE_p .

L'évolution de ΔE_p en fonction du temps est représentée par la figure III.8(a). On constate bien la diminution progressive de l'écart entre le pic d'oxydation et le pic de réduction. La figure III.8(b) représente l'évolution de la charge totale Q_{ox} issue de l'oxydation en fonction du temps. La charge semble osciller autour d'une valeur moyenne 3,6 mC. Cette valeur stable est à priori logique. En effet, bien que la conductivité du réseau de MWNT augmente, la quantité totale de FcMeOH oxydable dans la bille de gel, qui fonctionne comme une électrode poreuse, reste constante. La connectivité de la partie conductrice de la bille est suffisante pour adresser la totalité de son volume.

III.1.3.3 Vers un suivi cinétique de la désorption du tensioactif

Afin de compléter l'observation faite par voltampérométrie, il serait intéressant de suivre par dosage la fuite du tensioactif.

Dans les formulations que nous utilisons, une bille à 1,5 % en MWNT contient 1,125% de Brij35. Le tensioactif dans la bille peut se trouver sous différents états : adsorbé sur les MWNT ($\simeq 70$ %) ou en solution ($\simeq 30$ %) sous la forme de micelles et libres. En connaissant la concentration de Brij35 dans l'eau de dialyse, le volume du réservoir de dialyse, le nombre de billes dialysées et leur masse avant gélification, il est possible de savoir si la totalité du Brij35 (adsorbé et en solution) a été éliminée de l'hydrogel.

Pour cela, on fait gélifier une goutte de mélange alginate 1 %/MWNT 1,5 %-Brij35 1,125 % dans 50 mL de BaCl_2 à 20 mmol.L^{-1} . La bille est ensuite laissée sous agitation dans le bain pendant 24 heures. Le poids d'une goutte, 36 mg, est obtenue en faisant une moyenne sur 28 gouttes. On a donc 0,40 mg de Brij dans une bille. Après 24 heures, la tension de surface du bain extérieur est mesurée par méthode de la goutte pendante (voir II.2.2). Elle vaut 59 mN.m^{-1} à 23°C . La tension de surface d'une solution de BaCl_2 à 20 mmol.L^{-1} est mesurée

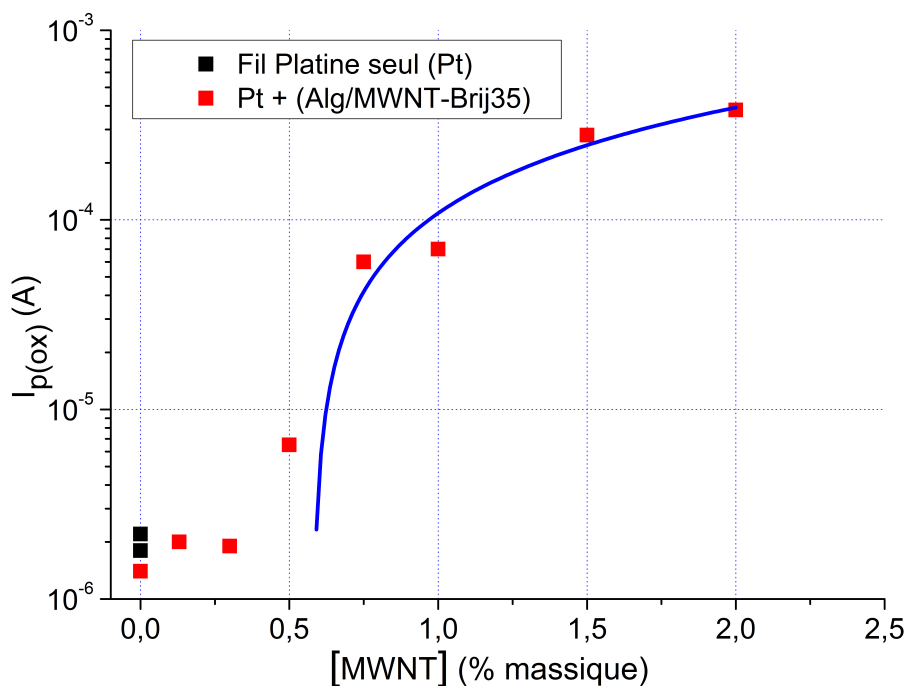


FIGURE III.9 – Évolution du courant de pic d’oxydation en fonction du pourcentage massique de nanotubes dans des billes Alg/MWNT. Une percolation du réseau de nanotubes est détectée entre 0,5 et 0,75 % massique. La ligne pleine représente l’ajustement des points de pourcentage supérieur à 0,5% par la loi de puissance (III.20).

comme étant identique à celle de l’eau pure (72 mN.m^{-1}). D’après la courbe de la figure II.9(b), la tension superficielle du bain correspond à une concentration en solution de $6.10^{-6} \text{ mmol.L}^{-1}$ soit 0,36 mg de Brij éliminé dans une bille. Environ 90 % du Brij initialement présent dans la bille a donc été dialysé. Cette expérience a été reproduite 2 fois. Des pourcentages de dialyse de 126 % et 70 % ont été obtenus. Toutes ces valeurs attestent de la désorption d’au moins une partie du Brij adsorbé sur les MWNT. Cependant elles sont très disparates. La variabilité de ces mesures provient certainement de la courbe d’étalonnage (II.9(b)). Une incertitude de $0,5 \text{ mN.m}^{-1}$ sur la tension de surface peut engendrer une incertitude de l’ordre de 50 % sur la concentration.

Une autre voie de dosage devrait donc être envisagée pour connaître la concentration du Brij en solution avec plus de précision. Il serait également intéressant de suivre la fuite du tensioactif afin de savoir si la concentration dans l’eau de dialyse peut être rapprochée des mesures de courant de pic d’oxydation. L’observation d’une dynamique similaire confirmerait la corrélation entre la désorption du tensioactif et la connexion du réseau de nanotubes.

III.1.4 Augmentation du courant de pic d’oxydation en fonction du pourcentage MWNT

Outre le de temps de dialyse, la quantité de MWNT présente dans la formulation joue également un rôle primordial dans la création d’un réseau conducteur. Nous avons vu dans le chapitre précédent que le réseau de nanotubes semble se connecter macroscopiquement à

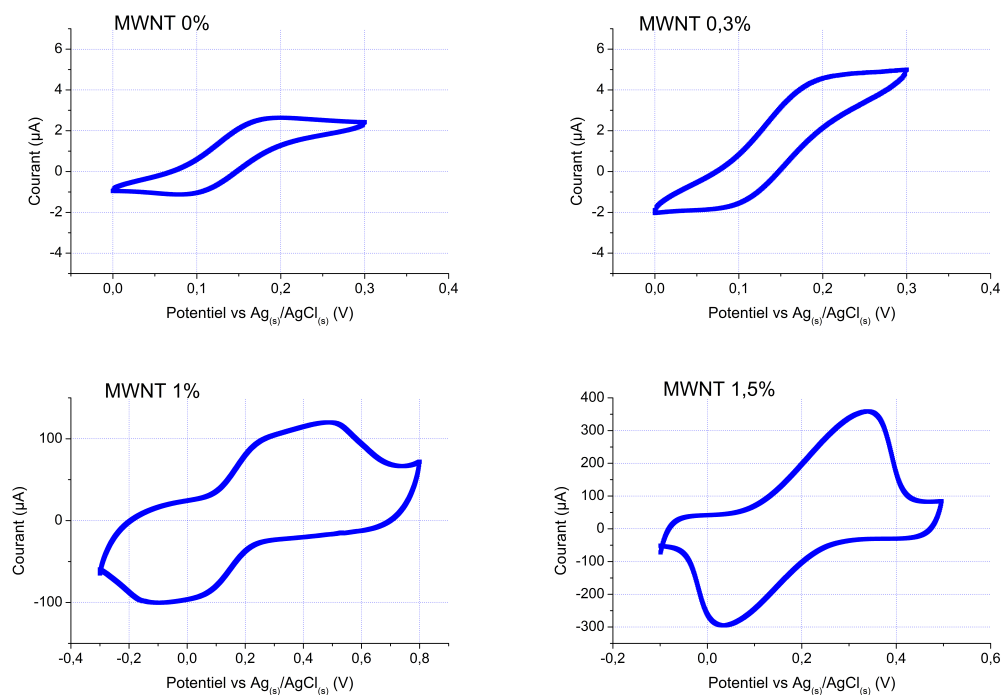


FIGURE III.10 – Évolution des voltampérométries de billes Alg/MWNT connectées par un fil de platine en fonction du pourcentage MWNT. Les mesures sont réalisées dans une solution de FcMeOH à 1 mmol.L^{-1} . Vitesse de balayage : 10 mV.s^{-1} .

partir de 0,75 % de MWNT. Il est possible de retrouver ce seuil de percolation à partir d'une mesure électrochimique. Dans ce but, des billes Alg/MWNT-Brij35 dialysées, contenant un pourcentage croissant en MWNT, sont connectées par un fil de platine et utilisées comme électrode. On mesure alors le $I_{p(\text{ox})}$ par CV à 10 mV.s^{-1} , pour chaque pourcentage. Les résultats sont présentés sur la figure III.9. Une augmentation importante du courant est constatée entre 0,3 et 0,75 % de MWNT. Elle correspond au changement de comportement entre une électrode similaire au fil de platine de surface de l'ordre du mm^2 et une électrode poreuse de surface supérieur au cm^2 . On retrouve donc le seuil de percolation détecté par les mesures d'impédance.

La figure III.10 expose des CV à différents pourcentages de MWNT contenu dans l'hydrogel. Aux bas pourcentages, la CV est similaire à celle obtenue par un fil de platine seul. À 1% de MWNT, le signal obtenu correspond à une électrode macroscopique. le réseau de nanotube est connecté sur l'ensemble de la bille. La vague d'oxydation large témoigne d'une grande résistivité de l'hydrogel. À 1,5% de MWNT, on observe une augmentation de la valeur de $I_{p(\text{ox})}$ et un affinement de pic d'oxydation. L'ajout de MWNT supplémentaires permet d'augmenter la surface de l'électrode et d'améliorer la conductivité du réseau à l'intérieur de la bille.

Dans le cas d'un système présentant un seuil de percolation, il est généralement possible d'ajuster les points expérimentaux par une loi de puissance caractéristique des systèmes

percolés [66] :

$$I_{p(\text{ox})} = \Delta I_0 (x - x_c)^\alpha \quad (\text{III.20})$$

avec ΔI_0 un paramètre d'ajustement, α un exposant positif, et x_c la fraction critique de percolation.

L'ajustement des mesures pour les pourcentages supérieurs ou égaux à 0,5% est représenté par la ligne bleue de la figure III.9. Elle donne une fraction critique de 0,58 %. La valeur de l'exposant α est de 1. Cette valeur est similaire aux exposants trouvés dans les cas de percolations électriques dans des composites polymères/nanotubes. Leur valeurs sont généralement compris entre 1 et 4 [11].

La connexion électrique de l'hydrogel composite Alg/MWNT a permis d'étudier son utilisation en tant qu'électrode macroscopique. Nous avons observé par électrochimie la cinétique de connexion du réseau conducteur. Nous savons à présent qu'une bille conductrice sous potentiel peut être le siège d'une réaction électrochimique. La seconde partie de ce chapitre rapporte l'utilisation d'une méthode originale dans la caractérisation de billes d'hydrogel Alg/MWNT-Brij35, la microscopie électrochimique. Cette technique permet notamment d'imager la conductivité d'un substrat plat en deux dimensions.

III.2 Étude de l'hydrogel par microscopie électrochimique

L'introduction de particules solides tels que les nanotubes de carbone permet la création d'hydrogels composites conducteurs. Les matériaux hybrides contenant des MWNT sont difficilement observables par microscopie classique. En effet, les nanotubes absorbent les longueurs d'ondes du visible et ne permettent pas l'observation en transmission ou réflexion. D'autres techniques comme la microscopie à force atomique (AFM) ou la microscopie électronique à balayage (MEB) pourraient être envisagées pour imager le gel d'alginate/MWNT. Cependant, ces techniques sont difficilement utilisables en conditions environnementales. L'imagerie MEB non-environnementale nécessite la déshydratation de l'échantillon. Cette déshydratation du matériau entraînerait une modification de sa structure.

La microscopie électrochimique (*Scanning electrochemical microscopy*, SECM) permet la caractérisation d'objets complexes comme des vésicules [25][128] ou des microbilles [65] sans perturbation physique et in situ. Cette technique peut quantifier les transferts ioniques à travers des matériaux perméables [118] et localiser des sites conducteurs sur une interface [5]. En 2010, Kim et al. [64] rapportent la détection d'un nanotube isolé par imagerie SECM. Il est également possible d'analyser un réseau de nanotubes par cette méthode [141]. Ce réseau peut éventuellement être inclus dans une matrice polymère [120][98].

La microscopie électrochimique semble donc adaptée pour l'observation et l'identification de sites actifs de la conduction dans notre matériau composite alginate/MWNT. Nous présentons dans la suite le principe général de la SECM ainsi que les spécificités liées à l'étude d'un

hydrogel perméable par cette technique.

III.2.1 La microscopie électrochimique (SECM)

III.2.1.1 Principe de fonctionnement

La microscopie électrochimique repose sur la mesure de courants électrochimiques à l'aide d'ultramicroélectrodes (UME). Les UME sont des électrodes dont le rayon est compris entre quelques nanomètres et $25 \mu\text{m}$. Elles sont généralement constituées d'un fil de platine scellé dans un capillaire en verre. Le fil est ensuite poli afin d'obtenir une électrode en forme de disque plan. On peut définir R_g , le rapport entre le diamètre du capillaire H et le diamètre de l'électrode r . Dans le cadre d'une voltampérométrie cyclique, le faible diamètre de l'UME permet l'obtention d'un régime stationnaire en un temps très court : $t \simeq r^2/D \simeq 0,5 \text{ s}$ avec D le coefficient de diffusion de l'espèce red/ox ($D = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) et $r = 25 \mu\text{m}$. Si un potentiel adapté à la réduction ou à l'oxydation immédiate d'une espèce en solution est appliqué à l'UME, le courant stationnaire vaut alors :

$$i_{\text{stat}} = 4nFDC_{\text{sol}}r$$

avec n le nombre d'électrons impliqués, F la constante de Faraday et C_{sol} sa concentration en solution.

Lors d'une mesure SECM, l'UME est placée dans une solution électrolytique contenant une espèce red/ox. Un potentiel constant est appliqué à l'électrode de mesure par rapport à une électrode de référence immergée dans la même solution. Si le courant mesuré est assez faible, il n'altère pas le potentiel de l'électrode de référence. Celle-ci peut alors jouer le rôle de contre-électrode. Sinon une troisième électrode est ajoutée au système. Le courant traversant l'électrode de mesure est suivi grâce à un potentiostat. Loin de tout substrat ou interface, le courant mesuré vaut i_{stat} . À proximité d'un échantillon, la diffusion de l'espèce red/ox jusqu'à l'électrode est perturbée. La modification du courant mesuré donne des informations sur la nature du matériau à proximité de l'UME. Il existe plusieurs modes d'utilisation de la SECM. Dans ces travaux, nous avons utilisé un mode permettant l'étude de la conductivité des interfaces, le mode "régénération" (*feedback*) [9][12].

III.2.1.2 Le mode *Feedback*

Le mode *Feedback* est basé sur la mesure de variations du courant à l'UME en fonction de la distance d entre l'UME et l'échantillon. L'électrode est placée dans une solution contenant une espèce électroactive sous sa forme réduite. Un potentiel correspondant au courant de plateau d'oxydation de cette espèce est appliqué à l'électrode de mesure. Loin de l'échantillon ($d > 10*r$), l'espèce red/ox diffuse librement jusqu'à l'électrode et le courant mesuré est égal à i_{stat} . L'UME est ensuite approchée de l'échantillon. On distingue alors deux situations limites dépendant de la nature du substrat analysé. Elles sont illustrées par les cas B et C de la figure III.11.

Lors de l'approche d'un échantillon isolant, la diffusion des espèces est progressivement gênée et le courant mesuré diminue. On obtient alors une régénération négative.

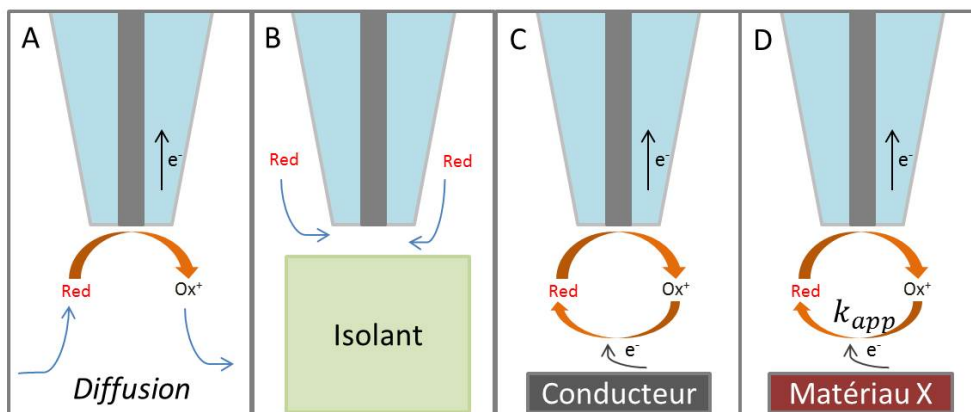


FIGURE III.11 – Schéma de principe du mode "régénération" en fonction du positionnement de l'UME et de la nature du substrat. (A) Loin de tout substrat ; (B) Proche d'un substrat isolant ; (C) Proche d'un substrat conducteur parfait ; (D) Proche d'un substrat conducteur non parfait, la régénération de l'espèce dépend alors de la constante de transfert électronique apparente (k_{app}).

Lors de l'approche d'un échantillon conducteur, la diffusion est également gênée mais l'espèce oxydée à l'électrode peut immédiatement être réduite *via* le substrat. Il y a alors régénération de l'espèce de départ, d'où le nom de la méthode *Feedback*. Le courant observé dépend alors de la distance entre l'UME et le substrat et de la capacité de l'échantillon à produire une réduction rapide de l'espèce oxydée. Si la réduction est assez rapide, on observe une augmentation de courant appelée régénération positive.

III.2.1.3 Les courbes d'approche

Le tracé de i en fonction de la distance à l'échantillon d est appelé courbe d'approche. En général, l'approche se réalise selon un axe z perpendiculaire à la surface que l'on veut étudier. Ces courbes sont représentées avec des grandeurs normalisées : le courant normalisé ($I = i_z/i_\infty$ avec $i_\infty = i_{stat}$) en fonction d'une distance normalisée ($L = d/r$ où r est le rayon de l'UME). La figure III.12 expose deux courbes d'approche correspondant aux deux cas limites explicités précédemment. La courbe verte décrit l'approche d'un substrat parfaitement conducteur. Une fois l'espèce red/ox oxydée à l'électrode elle est immédiatement réduite à la surface du substrat. Un cycle d'oxydation-réduction se met alors en place (voir III.11 (C)). La vitesse du cycle est contrôlée par la diffusion des espèces entre l'UME et le substrat. La réaction est donc d'autant plus rapide que la distance entre l'électrode et le substrat est faible. Le courant diverge vers l'infini lorsque L tend vers zéro. La courbe rouge décrit l'approche d'une surface parfaitement isolante. La diffusion des espèces est de plus en plus gênée à mesure que l'électrode s'approche de la surface. Le courant diminue jusqu'à zéro lorsque la diffusion des espèces est stoppée.

Les courbes expérimentales de ces deux cas limites peuvent être ajustées par des courbes issues de simulations numériques. En résolvant les équations de diffusions pour une géométrie d'électrode de type disque plan, on peut trouver dans la littérature des expressions analytiques de courbes d'approche pour les cas limites de substrats isolants et parfaitement conducteurs [9]. Ces expressions donnent l'évolution du courant en fonction de L et R_g [9]. Elles supposent que

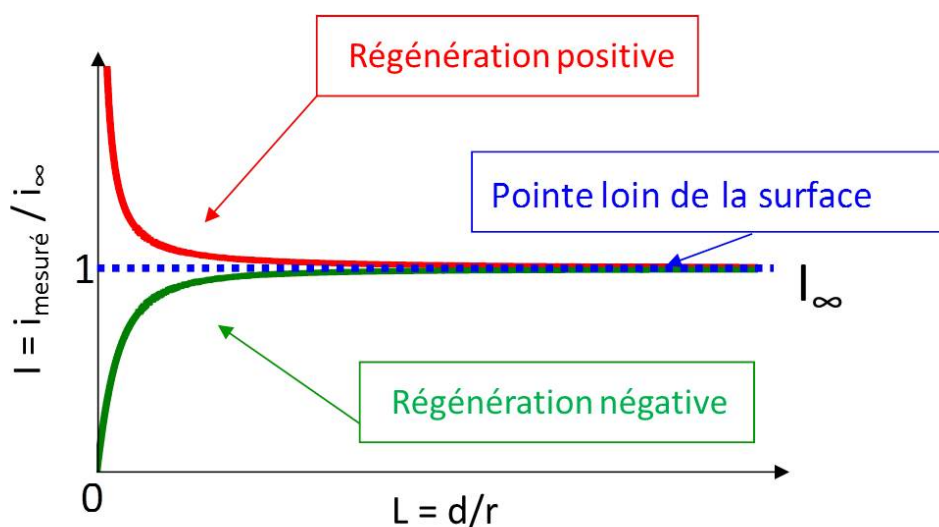


FIGURE III.12 – Courbe d’approche d’une UME sur une surface parfaitement conductrice (rouge) et parfaitement isolante (vert) [91].

les surfaces présentent une réactivité uniforme et sont parfaitement isolantes ou conductrices. Les coefficients de diffusion des espèces réduites ou oxydées sont supposés égaux.

Cas intermédiaire

L’approche expérimentale d’une surface se situe entre les deux cas limites décrits précédemment (voir la figure III.11 (D)). Le courant mesuré à l’UME est en réalité limité par la cinétique de régénération du médiateur red/ox à la surface. À l’approche de la surface, l’espèce électroactive est partiellement régénérée.

Au substrat, le flux de régénération de l’espèce électroactive sous sa forme réduite s’écrit :

$$D \frac{\partial [\text{Red}]}{\partial z} \Big|_{\text{interface}} = k_{\text{app}} [\text{Ox}]_{\text{interface}} \quad (\text{III.21})$$

avec D le coefficient de diffusion de l’espèce red/ox dans l’eau pure, k_{app} , la constante de transfert de charges apparente.

En première approche, lorsque l’UME est proche du substrat, le flux de régénération au substrat est égal au flux de régénération détecté par le microélectrode. La régénération est alors gouvernée par un paramètre adimensionnel K :

$$K = k_{\text{app}} \frac{r}{D} \quad (\text{III.22})$$

avec r le rayon de l’UME.

La résolution numérique exacte des équations de diffusion/réaction est modulée par une valeur K . La détermination de K permet d’ajuster la courbe simulée à la courbe expérimentale.

Pour un isolant, $k_{\text{app}} = 0$, et pour un conducteur parfait $k_{\text{app}} = \infty$. Les valeurs de k_{app}

Chapitre III. Caractérisation de l'hydrogel composite conducteur par électrochimie

permettent donc de comparer des échantillons en fonction leur vitesse de réduction (k_{app}) ou leur conductivité apparente.

III.2.1.4 Le mode *Feedback* sur un substrat non connecté

Il est possible d'effectuer des mesures de SECM sur des substrats non connectés électriquement.

En l'absence de connexion, le potentiel du substrat est identique à celui de la solution. Il est donc fixé par la concentration des espèces électroactives.

Dans le cas où seule la forme réduite est mise en solution, $[Ox]$ en solution est très faible ($\simeq 0$). Lors d'une mesure SECM, l'UME est portée au potentiel d'oxydation et approchée d'un substrat. Localement, la concentration $[Ox]$ augmente fortement. Pour rééquilibrer les concentrations, la substrat agit alors comme une source de charge et réduit l'espèce oxydée. L'aire du substrat étant bien supérieure à celle de l'UME, les charges circulent dans le matériau pour oxyder une espèce en dehors du champ d'action de l'électrode. En général, le volume expérimental est très grand devant les dimensions de l'électrode et les expériences sont limitées dans le temps. Ces conditions permettent de maintenir les concentrations des espèces en solution globalement constante. Le potentiel de la solution reste donc stable.

La SECM est un outil électrochimique adapté à l'étude des surfaces. En mode *Feedback*, il est possible de quantifier les transferts électroniques ayant lieu sur des substrats. De plus des modèles théoriques permettent l'évaluation des constantes apparentes de transfert de charges. Nous allons à présent utiliser cette technique pour étudier la conductivité des billes d'hydrogel composite présentées dans le chapitre précédent.

Dans la suite de ce chapitre, les mesures de SECM ont été effectuées sur des billes non connectées électriquement.

III.2.2 Approche de l'hydrogel Alginate/MWNT-Brij35 par SECM

III.2.2.1 Protocole et dispositif de mesure SECM

Les approches de microscopie électrochimiques ont été effectuées au sein du laboratoire ITODYS à l'université Paris Diderot en collaboration avec Jean-Marc Noël. Le dispositif utilisé est illustré sur la photo de la figure III.13. Une cuve contenant la solution d'espèce red/ox et la bille à étudier est placée sous un système d'électrodes : une UME de platine de diamètre 25 μm centrée au dessus de la bille ($R_g = 3,5$) et un fil de platine de 250 μm de diamètre, placé dans la solution d'espèce redox à 1 cm de l'UME. Le fil de platine est à la fois une électrode de référence et une contre-électrode. Ces électrodes sont fixées sur une plateforme mobile selon trois axes et contrôlée par ordinateur. Lors d'une approche de mesure SECM, la plateforme est déplacée verticalement. La vitesse de déplacement est fixée à 1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour éviter tout phénomène de convection pouvant perturber la mesure. L'électrochimie aux électrodes est contrôlée par un potentiostat (CH Instrument, CH660A).

Dans la suite, la solution utilisée pour les mesures SECM est composée de 1 mmol.L⁻¹ de FcMeOH, 0,1 mol.L⁻¹ de KCl et 1 mmol.L⁻¹ de BaCl₂. Avant chaque mesure, les billes sont

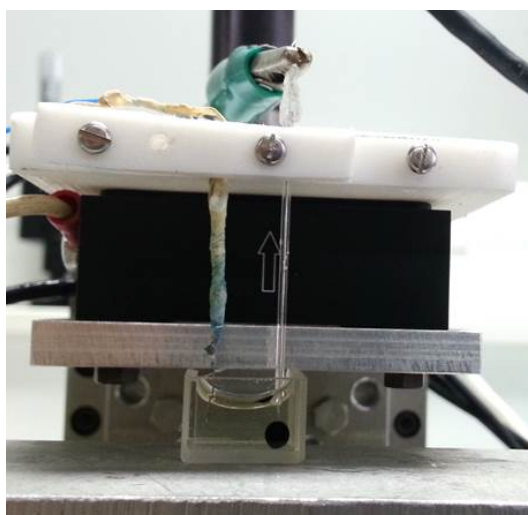


FIGURE III.13 – Photo du dispositif de mesure permettant des approches SECM. Il comprend une cuve contenant la solution d'espèces red/ox et la bille d'hydrogel étudiée, une UME positionnée au dessus de la bille (droite) et une électrode de référence/contre-électrode (gauche).

équilibrées 30 minutes dans cette solution d'étude.

III.2.2.2 La mesure de SECM sur des hydrogels perméables

L'étude des hydrogels par SECM diffère de l'étude classique de surfaces pleines. En effet, la perméabilité des hydrogels modifie l'évolution du courant mesuré par une UME. La courbe d'approche enregistrée sur un hydrogel non conducteur est différente de celle mesurée sur un substrat isolant classique. Ces approches sont présentées sur la figure III.14. Au voisinage d'une bille d'alginate à 1%, le courant ne chute pas jusqu'à zero. Ce phénomène est dû à la partition de l'espèce red/ox entre l'eau et le gel et à sa diffusion au sein des deux phases. Le courant enregistré à $L = 0$ est non nul, car l'espèce sous sa forme réduite est présente dans le gel et peut encore diffuser du gel à l'électrode et y subir un oxydation.

Ce phénomène de perméation doit être pris en compte *via* la définition d'un paramètre caractérisant le coefficient de partage de l'espèce red/ox entre les 2 phases. Pour la détermination de k_{app} , Frédéric Kanoufi a développé un modèle afin d'adapter la résolution numérique à l'étude des hydrogels. Le modèle est schématisé sur la figure III.15. À tout instant, l'équilibre des concentrations en espèce red/ox entre l'eau et le gel est défini par le coefficient de partition P :

$$P_{Alg/H_2O} = \frac{C_{gel}^{eq}}{C_{H_2O}^{eq}}$$

À proximité de l'électrode, l'oxydation de l'espèce red/ox est considérée comme immédiate . Les conditions limites en coordonnées cylindriques sont donc :

- En solution, loin de l'électrode : $[Red] = C_0$, $[Ox] = 0$, $\frac{\partial Red}{\partial R} = 0$ et $\frac{\partial Red}{\partial z} = 0$
- En solution, $D = D_{H_2O} = D(Red)_{H_2O} = D(Ox)_{H_2O}$

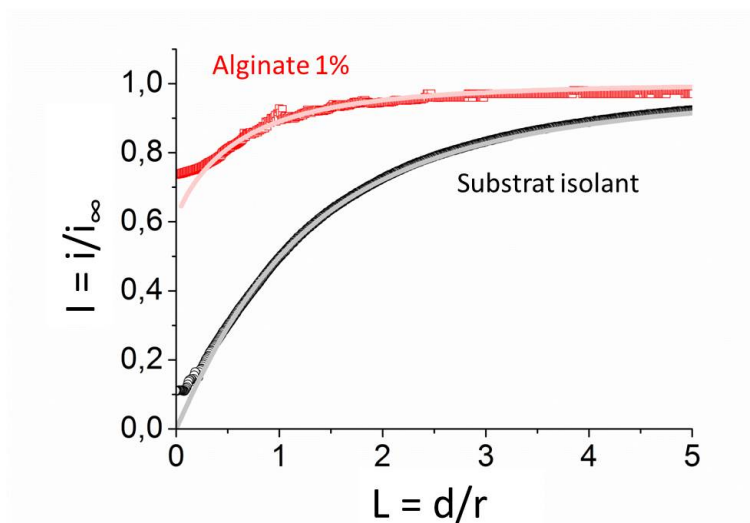


FIGURE III.14 – Approches SECM d’une électrode sur un substrat isolant (courbe noire) et sur une bille d’alginate à 1 % (courbe rouge) dans une solution contenant 1 mmol.L^{-1} de FcMeOH. Les points représentent les mesures expérimentales. Les lignes pleines représentent les expressions analytiques incluant les phénomènes de perméation (rouge) et sans perméation (grise). Vitesse d’approche $1 \mu\text{m.s}^{-1}$.

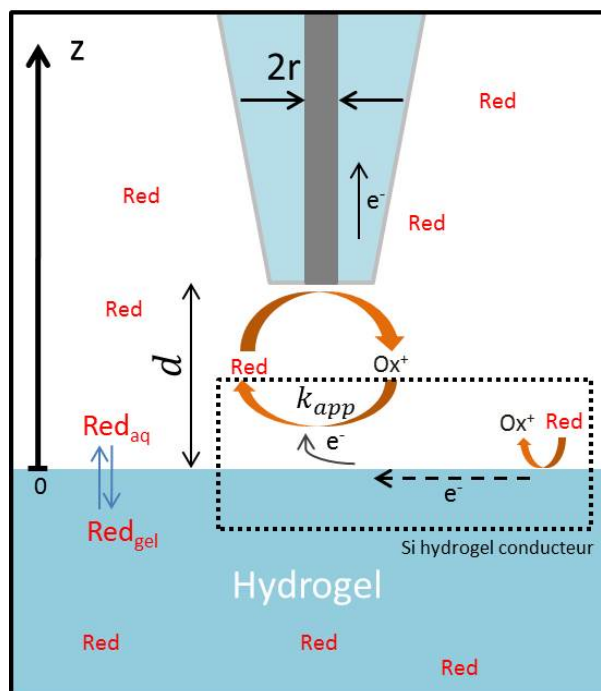


FIGURE III.15 – Modèle de perméation de l’espèce red/ox lors d’une approche SECM. Cadre en pointillés noirs : ajout au modèle en présence d’un réseau conducteur dans l’hydrogel. Cette modification du modèle tient compte de la régénération de l’espèce sous sa forme réduite par le réseau conducteur avec une constante apparente k_{app} .

III.2. Étude de l'hydrogel par microscopie électrochimique

- Dans l'hydrogel, $D_{Alg} = D(\text{Red})_{Alg} = D(\text{Ox})_{Alg}$
- À l'électrode en $z = d$: $[\text{Red}] = 0$ et $[\text{Ox}] = C_0$

Dans le cas d'un hydrogel non conducteur, la régénération de l'espèce oxydée en espèce réduite n'a pas lieu.

Ces conditions permettent la résolution des équations de diffusion pour chacune des espèces et dans chacune des phases en coordonnées cylindrique :

$$\frac{\partial \text{Red}}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \text{Red}}{\partial R^2} + \frac{1}{R} \frac{\partial \text{Red}}{\partial R} + \frac{\partial^2 \text{Red}}{\partial z^2} \right) \quad (\text{III.23})$$

La résolution est effectuée par la méthode des éléments finis via le logiciel COMSOL.

Le flux d'espèces réduites et le courant à électrode s'expriment alors comme suit :

$$J_{\text{elec}} = F D_{H_2O} \frac{\partial \text{Red}}{\partial z} \Big|_{\text{elec}} \text{ et } I = -J_{\text{elec}} S \quad (\text{III.24})$$

avec F la constante de Faraday et S l'aire de l'UME.

Sur la figure III.14, la ligne pleine rouge représente le courant correspondant à la résolution numérique utilisant P_{Alg/H_2O} , D_{Alg} et D_{H_2O} du ferrocène méthanol (voir Annexe A). Le modèle théorique reproduit convenablement la courbe d'approche sur une bille d'alginate.

Dans le cas où l'hydrogel est conducteur, ce modèle est complété par l'ajout d'une régénération de l'espèce réduite *via* l'hydrogel conducteur, source d'électrons. Cette régénération est effectuée avec une constante de transfert k_{app} . En première approximation, on suppose que la régénération s'effectue uniquement en surface de l'hydrogel. Cette hypothèse engendre une condition supplémentaire à l'interface solution/hydrogel ($z = 0$) similaire à (III.21) :

$$D_{H_2O} \frac{\partial [\text{Red}]}{\partial z} \Big|_{z=0} = k_{\text{app}} [\text{Ox}]_{z=0} \quad (\text{III.25})$$

La courbe d'approche sur un hydrogel non conducteur correspond alors au cas limite de régénération négative avec $k_{\text{app}} = 0$.

III.2.2.3 Évolution du *feedback* en fonction du pourcentage de MWNT

Plusieurs séries de billes Alg/MWNT-Brij35 sont fabriquées par le protocole présenté au chapitre précédent (II.2.4). Le pourcentage d'alginate est fixé à 1% pour toutes les formulations. Suivant les séries, la quantité de MWNT varie entre 0 et 2%. Une fois les billes dialysées, elles sont approchées par SECM. Les courbes expérimentales sont présentées sur la figure III.16.

L'ajout de nanotubes dans la bille d'hydrogel induit une régénération positive dès le plus bas pourcentage de MWNT (0,13%). L'augmentation du courant est d'autant plus grande que la quantité de nanotubes est importante dans l'hydrogel. La régénération positive témoigne de la régénération du FcMeOH *via* les nanotubes à l'interface eau/bille.

Les constantes de transfert de charges adimensionnelles K correspondantes aux courbes d'approche expérimentales sont estimées analytiquement par le modèle de perméation exposé en III.2.2.2 avec le coefficient de partition $P = 1,6$ et les coefficients de diffusion $D_{H_2O} = 7,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $D_{Alg} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (voir Annexe A).

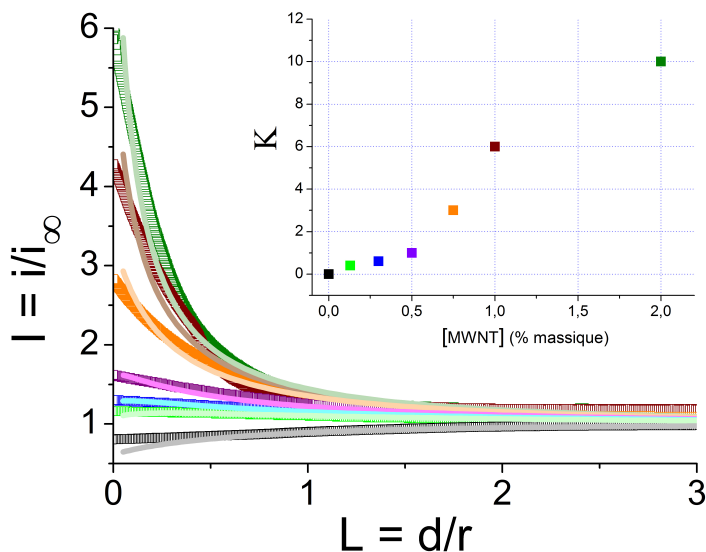


FIGURE III.16 – Courbes d’approche SECM sur des billes Alg/MWNT contenant des taux variables de MWNT : 0% (noir), 0,13% (vert fluo), 0,3% (bleu), 0,5% (violet), 0,75% (orange), 1% (marron), 2% (vert). Les ligne pleines représentent la simulation avec les valeurs de K reportées dans le graphique en encart. Vitesse d’approche $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

En ajustant la valeur de K , les courants calculés semblent approcher raisonnablement les valeurs expérimentales. Les hypothèses du modèle semblent donc en accord avec l’expérience.

Les K obtenus rendent compte de la régénération du FcMeOH par le réseau de nanotubes et de la diffusion de l’espèce red/ox depuis l’hydrogel vers l’électrode. L’augmentation de K en fonction du % de MWNT indique que le réseau est de plus en plus connecté et conducteur. Cette connexion des nanotubes est suffisante pour évacuer les charges issues du cycle de l’UME vers la bille ou la solution, sur des distances au moins supérieures à la taille de l’électrode.

On remarque que l’augmentation de K ne présente pas de saut de valeur marqué qui témoignerait de la percolation du réseau de nanotubes. Ce phénomène s’explique par la nature de la mesure. Une approche SECM permet l’observation de propriétés locales de conduction électrique. Même à faible quantité de MWNT une connexion locale est observable par SECM. À l’opposée, une mesure électrochimique macroscopique permet l’observation de la connexion globale de l’électrode (paragraphe III.1.4).

III.2.2.4 Suivi de la dialyse du tensioactif par SECM

Comme pour la mesure macroscopique (paragraphe III.1.3), il est possible de suivre la connexion locale du réseau de MWNT en fonction du temps de dialyse par mesure de SECM. Pour cela, une bille Alg 1%/MWNT 1,5%-Brij35 est gélifiée dans $rmBaCl_2$ sans étape de dialyse. Elle est placée dans la solution de mesure et approchée par une UME à différents temps. Entre deux manipulations, la bille est laissée dans la solution sans agitation. En fonction du temps, les courbes d’approches (figure III.17) montrent une régénération de plus en plus positive. Les valeurs de K évoluent en conséquence. On observe ici la connexion du réseau de

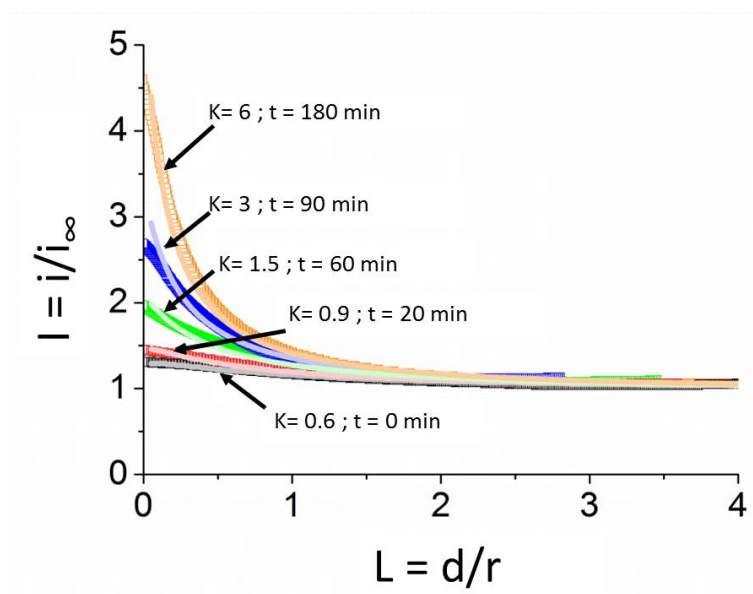


FIGURE III.17 – Courant d'oxydation en fonction de L pour une bille Alg/MWNT-Brij35 non dialysée. La bille est laissée dans la solution de mesure et approchée par l'UME à plusieurs temps.

nanotubes au fur et à mesure de la désorption du Brij35.

Après 180 minutes de dialyse, les courbes d'approches n'évoluent plus. Elles sont similaires à une mesure faite sur une bille de même formulation dialysée 24h et approchée immédiatement après immersion dans la solution de mesure.

Ici, le temps caractéristique de la connexion du réseau de MWNT est donc de 180 minutes. Ce temps est bien inférieur à celui obtenu par mesure macroscopique (~ 2000 minutes). La désorption du tensioactif s'effectue en priorité à la surface de la bille car c'est la partie la plus proche du réservoir de dialyse. La mesure de SECM étant une mesure de surface, il est donc logique d'observer une connexion plus rapide sur l'extérieur de la bille que sur l'ensemble de l'objet.

Une UME de rayon r permet typiquement de sonder un matériau dans une demi-sphère de rayon de l'ordre de $5r$. Une molécule de Brij35 diffuse sur cette distance, soit $60 \mu\text{m}$, en 20 secondes. Microscopiquement, le temps de connexion du réseau est supérieur au temps de diffusion du tensio-actif. D'autres phénomènes physico-chimiques sont donc limitant dans la connexion du réseau, comme par exemple la cinétique de désorption du tensio-actif.

III.2.3 Imager la conductivité de surface

Jusqu'à présent, la mesure SECM nous a permis de sonder la conductivité électrique des billes Alg/MWNT en un point. En pratique, il est possible d'analyser l'ensemble d'une surface. Pour cela, l'électrode est placée à proximité de la surface afin d'enregistrer une régénération positive. Une fois l'approche effectuée, l'UME est balayée dans le plan xy , au dessus de la surface à hauteur constante. Le courant d'oxydation est alors enregistré pour chaque position. Par ce procédé on peut au choix : cartographier la conductivité d'un substrat plat, ou imager

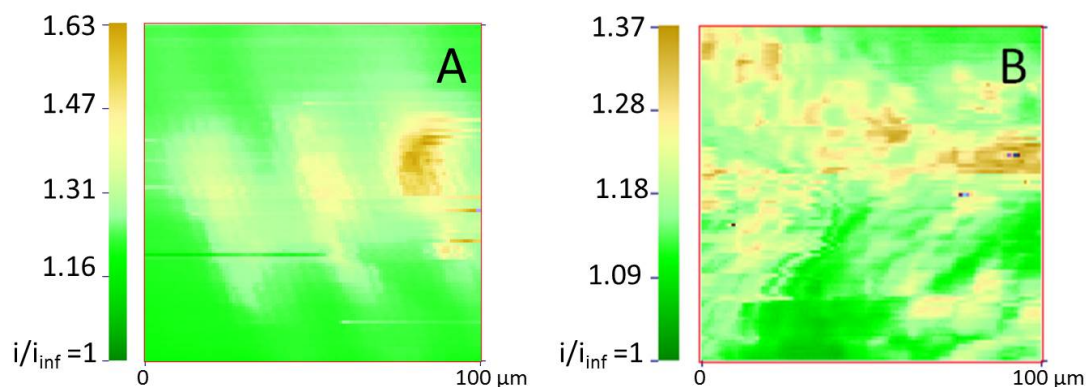


FIGURE III.18 – Images SECM enregistrées sur des billes Alg/MWNT 1%. Le courant est normalisé par le courant d'oxydation mesuré dans la solution, loin de la bille. (A) Bille Alg/MWNT-Brij35. (B) Bille Alg/MWNT-SDS. Images réalisées par Jean-Marc Noël.

la rugosité de surface d'un échantillon uniformément conducteur. La résolution de l'image obtenue dépend du diamètre de l'électrode utilisée [12]. Dans notre cas, L'électrode de mesure est un fil de platine de 500 nm de rayon, elle est déplacée à $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. La taille de l'électrode permet ici d'obtenir des images de précisions sub-micrométriques, c'est-à-dire comparable à une image optique.

La figure III.18 (A) représente une image SECM effectuée sur une bille conductrice Alg 1%/MWNT 1%-Brij35. En accord avec la morphologie du mélange non gélifié, on retrouve une homogénéité globale de la réponse en courant. Des structures linéaires apparaissent. Elle correspondent ici à la topologie de la surface de la bille. Ces stries sont créées par la contraction de l'hydrogel lors de sa formation. Elles ont déjà été observées lors de la fabrication de capsules à cœur liquide [18] (voir la figure I.12).

À titre de comparaison, cette image de surface peut être comparée à une surface hétérogène en conductivité. Durant ces travaux de thèse, un première étude a été effectuée sur des hydrogels Alg/MWNT-SDS par SECM. Elle a fait l'objet d'un article présenté en annexe B [92]. Dans cette étude, des billes Alg/MWNT-SDS sont approchées et imagées par une UME.

Avant la gélification, les mélanges Alg/MWNT-SDS sont fortement agrégés. Cependant les billes d'hydrogel composite qui en résultent présentent une régénération positive. Une image SECM effectuée sur un bille Alg/MWNT 1%-SDS est représentée par la figure III.18 (B) Elle révèle une forte hétérogénéité de réponse en courant liée à la mauvaise dispersion des charges.

III.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la conductivité des hydrogels Alg/MWNT par voie électrochimique. Dans un premier temps, nous avons montré qu'une bille d'hydrogel composite peut être connectée par contact avec un fil de platine. Une fois dialysée, la bille se comporte comme une électrode macroscopique résistive. Le réseau de nanotubes est le support de réactions d'oxydo-réduction, et permet le transport d'électrons sur des distances de l'ordre de la centaine de microns.

Microscopiquement, des phénomènes similaires sont observés. L'ajout de nanotubes dans la formulation augmente la conductivité de l'hydrogel. Ce phénomène, constaté même aux plus faibles pourcentages, témoigne d'une connexion du réseau de MWNT. Ce réseau permet le déplacement de charges sur une distance supérieure au diamètre de l'électrode. L'observation de la connexion des MWNT en fonction du temps de dialyse nous permet d'affirmer que la diffusion du tensioactif dans la solution n'est pas le facteur limitant cinétiquement. Le temps de connexion semble être conditionné par la forte affinité entre le tensio-actif et les nanotubes. La technique de SECM nous a enfin permis d'imager la conductivité des billes d'hydrogel Alg/MWNT. Le tensioactif utilisé pour la stabilisation des nanotubes avant gélification a une influence sur le réseau final obtenu après dialyse. En effet, des réseaux bien plus uniformes sont obtenus en choisissant le Brij35 plutôt que le SDS.

À la lumière des observations faites dans ce chapitre, il semble à présent raisonnable d'encapsuler des bactéries dans une membrane d'hydrogel composite Alg/MWNT. La capsule pourra être ensuite connectée par contact électrique. Sa membrane, sous potentiel, sera le support de la croissance des bactéries et permettra l'extraction des électrons générés par la population encapsulée.

Cette application biologique de l'hydrogel composite conducteur fait l'objet du dernier chapitre de cette thèse.

Chapitre IV

Une capsule "anode" de piles bactérienne.

Sommaire

IV.1 Étude de la croissance bactérienne compartimentée	96
IV.1.1 Étude de la croissance d'une bactérie modèle encapsulée, <i>Escherichia coli</i>	96
IV.1.2 Étude de la croissance encapsulée de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	106
IV.2 Production d'un courant électrique par <i>G. sulfurreducens</i> attachée à une électrode composite Alg/MWNT	110
IV.2.1 Dispositif de connexion électrique et de mesure de courant	110
IV.2.2 Courant généré par <i>G. sulfurreducens</i>	111
IV.3 La capsule "anode", un outil compartimenté pour sonder l'électroactivité bactérienne	114
IV.3.1 Dispositif de connexion d'une capsule à membrane conductrice	114
IV.3.2 Mesure de l'électroactivité d'une population de <i>G. sulfurreducens</i> encapsulée	115
IV.4 Conclusion	117

Nous avons jusqu'à présent formulé un hydrogel composite conducteur. Nous l'avons ensuite utilisé comme électrode dans le cadre d'une réaction d'oxydo-réduction. La dernière étape de ces travaux de thèse consiste en l'application de l'hydrogel Alg/MWNT dans le domaine des piles à bactéries. Notre matériau doit à terme constituer la membrane d'une capsule à cœur liquide contenant des bactéries électroactives. Dans un premier temps, nous caractérisons la croissance bactérienne dans ces bioréacteurs. Cette étude permettra de valider la biocompatibilité du procédé d'encapsulation par une membrane Alg/MWNT conductrice.

IV.1 Étude de la croissance bactérienne compartimentée

Comme présenté dans le chapitre I, les capsules à cœur liquide et à membrane d'alginate peuvent constituer des compartiments biocompatibles. Dans ces réservoirs, les croissances diffèrent des croissances classiques car elles s'effectuent à potentiel chimique constant. En effet la membrane étant semi-perméable, les petites molécules peuvent diffuser librement entre l'intérieur et l'extérieur de la capsule. En plaçant la capsule dans un grand volume, les concentrations en nutriments et déchets peuvent être considérées comme constantes. Le potentiel chimique du milieu ne varie donc pas, ou très peu. Par conséquent, il est intéressant d'étudier en détails la dynamique de ces croissances compartimentées.

Pour cela, nous avons étudié la croissance encapsulée d'une bactérie modèle, *Escherichia coli*.

IV.1.1 Étude de la croissance d'une bactérie modèle encapsulée, *Escherichia coli*

IV.1.1.1 La bactérie *Escherichia coli*, culture et croissance

E. coli est une bactérie à Gram négatif du tube digestif de nombreux mammifères dont l'homme. Se présentant sous la forme de bâtonnets, elle mesure entre 0,5 et 3 μm suivant sa dynamique de croissance et de division. *E. coli* est aujourd'hui le micro-organisme le plus étudié et utilisé en recherche. L'accumulation des connaissances et des techniques à son sujet font de *E. coli* un organisme modèle.

La souche de laboratoire utilisée dans cette étude est la souche MC4100 (CGSC# : 6152). Elle n'a pas de flagelle et ne développe pas de pili [100]. Son utilisation a été facilitée par les ajouts à son chromosome d'un gène de fluorescence (*yellow fluorescent protein*, YFP) et d'un gène de résistance à l'ampiciline [49]. Ces ajouts permettent d'identifier la bactérie par imagerie fluorescente, et de diminuer le risque de contamination par l'utilisation d'ampiciline dans les milieux de culture.

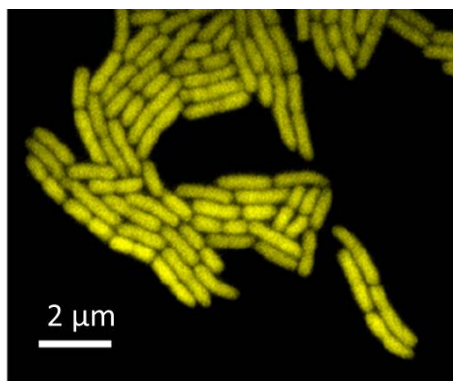


FIGURE IV.1 – Cliché de bactéries MC4100 YFP par microscopie de fluorescence. *Crédits : Denis Cottinet [26].*

IV.1. Étude de la croissance bactérienne compartimentée

Les conditions de culture de *E. coli*

La culture de *E. coli* est simple. Cette bactérie est capable de survivre et de se développer rapidement dans des environnements variés. En conditions optimales, son temps de division est de l'ordre de 20 minutes. Dans notre étude, le milieu de culture choisi est le Lysogeny Broth (LB). Le LB est un milieu nutritif contenant les composants nécessaires à la croissance de micro-organismes : des peptides, des vitamines, des oligo-éléments et des minéraux. Le LB utilisé au laboratoire contient également une concentration en NaCl de 5 g.L^{-1} .

Pour initier une culture, une souche de *E. coli* MC4100 est sortie du stock à -80°C et décongelée. $2 \mu\text{L}$ de la culture sont inoculés dans 5 mL de LB et placés dans une étuve à 37°C sous agitation. Après 12 heures d'incubation, la population est repiquée à nouveau dans du LB avec un facteur de dilution variant suivant l'expérience.

Cette nouvelle culture permet l'étude de la croissance bactérienne.

Suivi de la croissance de *E. coli*

La bactérie *E. coli* se divise de manière binaire en deux cellules filles à la suite d'une phase de croissance. Si le temps de division T_{div} est constant, la concentration bactérienne $c(t)$ évolue *via* la dynamique suivante :

$$c(t) = 2^{N(t)} * c_0 \quad (\text{IV.1})$$

avec c_0 la concentration initiale en bactéries à $t = 0$ et $N(t)$ le nombre de divisions en fonction du temps.

Comme $N(t) = t/T_{\text{div}}$, l'équation(IV.1) devient :

$$c(t) = 2^{t/T_{\text{div}}} * c_0 \quad (\text{IV.2})$$

D'où :

$$c(t) = c_0 * \exp(\ln 2 * t/T_{\text{div}}) \quad (\text{IV.3})$$

L'équation (IV.3) montre que si le temps de division est constant, alors la croissance de la population de bactéries est exponentielle.

La concentration de *E. coli* est suivie grâce à un spectromètre par des mesures de densité optique à 600 nm. La turbidité du milieu peut être reliée à la concentration en bactéries par millilitre (Bac.mL^{-1}) c par la relation suivante :

$$c = B * \Delta(d.o) = 4.10^8 * (d.o_{\text{culture}} - d.o_{\text{milieu}}) \quad (\text{IV.4})$$

avec $d.o_{\text{culture}}$ la densité optique mesurée sur l'échantillon et $d.o_{\text{milieu}}$ la densité optique mesurée sur le milieu sans bactérie. Cette relation est valable dans le domaine de linéarité du spectromètre, situé entre 0 et 1 de densité optique. Les cultures présentant une turbidité trop élevées sont donc diluées pour la mesure de la concentration bactérienne. Le facteur multiplicatif B est une grandeur standard utilisée en microbiologie, elle permet d'estimer la

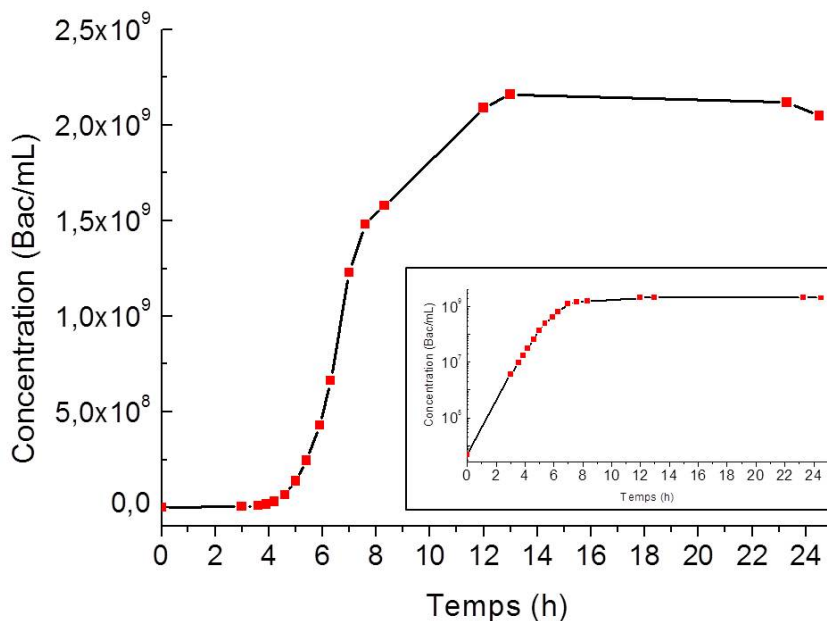


FIGURE IV.2 – Courbe de croissance d'une culture de *E. coli* inoculée à la concentration initiale de $4,5 \cdot 10^3$ Bac.mL⁻¹. Encadré : Concentration en fonction du temps tracée en échelle log/linéaire faisant apparaître la phase exponentielle.

concentration en bactéries en solution. Sa valeur est de $4 \cdot 10^8$ Bac.mL⁻¹ par unité de d.o ((u.d.o)). Cependant elle peut varier d'un facteur 2 à 10 suivant le type de bactéries, leur taille et l'âge de la culture. Il est important de garder cette variation à l'esprit dans la suite

La figure IV.2 représente la croissance d'une culture de *E. coli* dans du LB à 37 ° C sous agitation. Cette croissance peut se décomposer en plusieurs étapes :

— **La phase de latence**

Cette première phase est caractérisée par un taux de croissance nul. Lorsqu'une culture est repiquée, le temps de latence correspond au temps nécessaire à la population pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat. Lors d'une repique dans un milieu identique à la culture souche, le temps de latence est très faible, voir nul.

— **La phase de croissance exponentielle**

Lors de cette phase, les bactéries se divisent à temps de division constant. Le taux de croissance est alors maximum. Sur la figure IV.2, la phase exponentielle s'étend de 0 à 5 heures. Sur cette période, la courbe peut être approchée par l'équation (IV.3). L'exposant de l'exponentielle permet alors d'évaluer le temps de division. Dans notre cas, le temps de division de *E. coli* est de 22 minutes.

— **La phase de ralentissement**

Elle correspond à une diminution du taux de croissance. Ce ralentissement peut être lié à l'épuisement du milieu de culture et/ou à l'accumulation de déchets. Elle peut donner lieu à un début d'autolyse des bactéries. Sur la figure IV.2, la phase de ralentissement

IV.1. Étude de la croissance bactérienne compartimentée

s'étend de 5 à 7 heures.

- **La phase stationnaire** Cette phase est caractérisée par un taux de croissance nul. La division des bactéries compense la mortalité de la population. En état de déprivation, les bactéries synthétisent des protéines de manque qui les rendent plus résistantes. Lors de la phase stationnaire, la concentration en bactéries est de l'ordre de $2 \cdot 10^9$ Bactérie.mL⁻¹. Lorsque les ressources nutritives sont épuisées, cette phase peut être suivie d'une phase de déclin où le taux de croissance devient négatif.

Notons ici que la variabilité du facteur multiplicatif B n'influe pas sur l'évaluation des temps de division.

Après avoir exposé la croissance classique de *E. coli* en solution dans le LB, nous allons étudier la croissance de la bactérie dans des capsules à cœur liquide à membrane d'alginate.

Note : Pour ces applications en microbiologie, l'alginate est stérilisé (étuve à 70 ° C pendant 5 heures). Cette étape entraîne une diminution de 15 % de la viscosité à taux de cisaillement nul de la solution d'alginate. Cette diminution est certainement due à la réduction de la taille des chaînes macromoléculaires lors de l'élévation de la température.

IV.1.1.2 Protocole d'encapsulation et de culture de *E. coli*

L'encapsulation de *E. coli* consiste à isoler une ou plusieurs bactéries dans le cœur d'une capsule à membrane d'hydrogel. Le protocole de fabrication des capsules est décrit dans la partie I.3.2.1. Celui décrivant l'encapsulation de bactéries est illustré par la figure IV.3.

La solution de coque est composée d'alginate à 2 % et de 1 mmol.L⁻¹ de SDS. La solution de cœur est formulée par dilution au tiers d'une solution de milieu nutritif LB contenant une concentration connue de bactéries dans une solution de polyéthylène glycol (PEG, M = 3200 g.mol⁻¹) à 10 %. L'ajout de PEG permet d'augmenter la viscosité de la solution de cœur favorisant l'obtention de capsules à membrane fine d'épaisseur inférieure à 200 μm. Le PEG choisi est de faible masse molaire. Son rayon hydrodynamique est donc petit et inférieur à la taille des pores de l'hydrogel d'alginate. Après la gélification, il pourra diffuser librement hors de la capsule. Des mesures de fuites menées par réfractométrie ont permis d'estimer le temps de la fuite totale du PEG à 45 minutes.

Les vitesses d'injection des fluides sont contrôlées par des pousse-seringues. Le débit du cœur est fixée à 5 mL.h⁻¹ et celui de la coque à 2 mL.h⁻¹.

En sortie d'injecteur, les bi-gouttes tombent dans un bain de BaCl₂ à 20 mmol.L⁻¹ contenant quelques gouttes de Tween (0,1 % en volume). Une fois formées, les capsules sont laissées dans le bain pendant 1 minute. Elles sont ensuite transférées dans un milieu nutritif LB contenant 0,5 mmol.L⁻¹ de BaCl₂ et mises en culture à 37 ° C. Le BaCl₂ permet ici le maintien physique de l'hydrogel. En effet, les ions sodium monovalents sont très présents dans le LB (5 g.L⁻¹) et peuvent déstabiliser les points de réticulation alginate/baryum, en remplaçant les ions baryum dans l'hydrogel [113]. La présence de baryum en solution permet d'empêcher ce phénomène.

Pour déterminer des concentrations bactériennes dans les capsules, il est important de

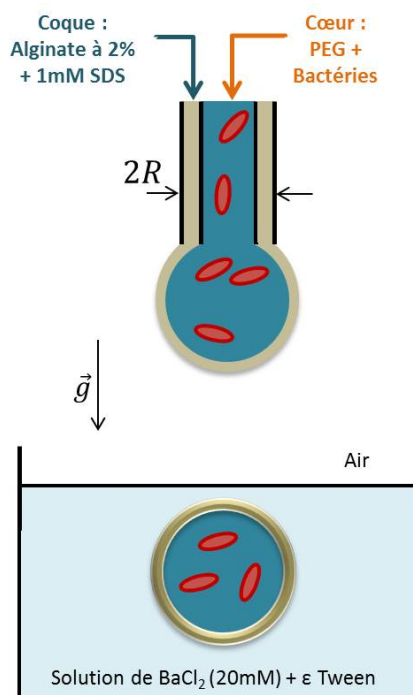


FIGURE IV.3 – Schéma représentant le procédé de fabrication de capsules à cœur liquide et à membrane d'hydrogel d'alginate contenant des bactéries. Une fois détachée, la bigoutte chute dans un bain de baryum qui entraîne la gélification de la solution d'alginate et l'encapsulation physique des bactéries. $R = 1$ mm.

connaître le volume du cœur de nos bioréacteurs. Pour cela, le poids d'une bi-gouttes non-gélifiées est déterminé par pesée. Connaissant les débits et les densités des solutions utilisées, le volume du cœur de la bi-goutte peut alors être calculé. Dans les conditions présentées ci-dessus, il est estimé à $20 \mu\text{L}$. La gélification de la membrane entraîne une contraction du fluide de coque. Nous considérons cependant que le volume du cœur n'est pas affecté par ce phénomène. À titre de comparaison, les volumes des milieux nutritifs baignant les capsules lors des cultures sont de l'ordre de 10 à 30 mL.

Les photos de la figure IV.4 illustrent le développement et la division des bactéries à l'intérieur de la capsule. En 12 heures, les bactéries colonisent la totalité de l'espace présent dans le cœur du réservoir sans contamination extérieure (voir photo IV.4 B). Une image de microscopie de fluorescence permet de constater la fluorescence du cœur liée à l'expression du gène YFP.

IV.1.1.3 Encapsulation monoclonale

La technique de fabrication par coextrusion permet l'encapsulation d'un nombre contrôlé de bactéries par capsule. Ce nombre peut être abaissé jusqu'à une seule bactérie pour des dilutions importantes dans la solution de cœur lors de l'encapsulation. Pour une concentration moyenne λ en bactéries par capsule, la loi de Poisson prévoit la probabilité $P(k)$ d'avoir k

IV.1. Étude de la croissance bactérienne compartimentée

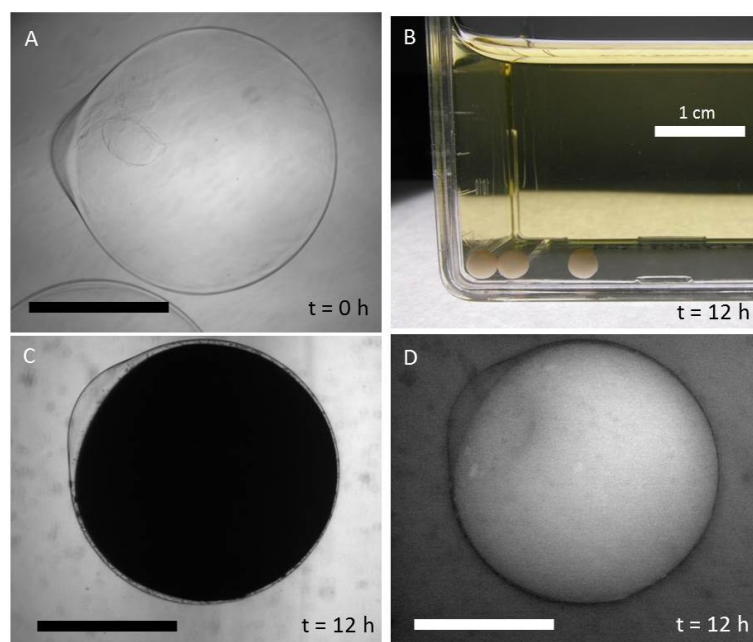


FIGURE IV.4 – Capsules à membrane d’alginate contenant *E. coli*. (B) Photo d’une flasque de culture contenant des capsules après 12 heures de culture. (A,C) Clichés de microscopie optique après l’encapsulation, et à $t = 12$ heures. (D) Cliché de microscopie à fluorescence d’une capsule pleine de *E. coli* à $t = 12$ heures. Émission à 490 nm. Échelles (A)(C)(D) : 2 mm.

bactéries par capsules :

$$P(k) = \frac{\lambda^k}{k} * e^{(-\lambda)} \tag{IV.5}$$

Par exemple pour $\lambda = 0,14$ on a :

k	0	1	2	3
$P(k)$	86,9 %	12,2 %	0,85 %	0,04 %

Trois expériences d’encapsulation monoclonale ont été réalisées. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Concentration du cœur (Bac/mL)	Concentration moyenne de bactéries par capsule (Bac/cap)	Nombre total de capsules étudiées	% théorique de capsules occupées	% expérimental de capsules occupées
97	1,95	30	86	93
5	0,1	113	10	16
5,5	0,11	155	11	17

La concentration moyenne de bactéries par capsule est calculée en utilisant le volume du cœur de la bigoutte déterminé plus haut ($20 \mu\text{L}$). Le pourcentage théorique de capsules occupées est calculé simplement par différence : $1 - P(k = 0)$. Après 12 heures de culture, les capsules contenant initialement des bactéries sont remplies. Le pourcentage expérimental de

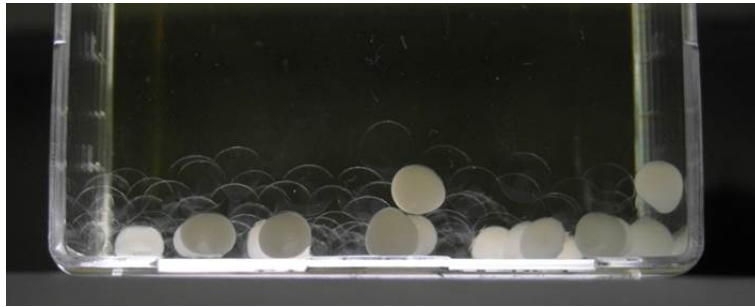


FIGURE IV.5 – Flasque de LB contenant des capsules issues d’une encapsulation monoclonale de *E. coli*. après 12 h de culture.

capsules occupées est donc obtenu par simple décompte des capsules troubles dans les flasques de culture (voir la figure IV.5).

Les résultats de l’encapsulation monoclonale sont accords avec les prévisions données par la loi de Poisson.

Cependant, pour toutes les encapsulations, le pourcentage expérimental est supérieur au pourcentage attendu par la loi de Poisson. Selon nous, cette différence provient probablement de la valeur du facteur multiplicatif B.

À partir des résultats de l’encapsulation, on peut calculer une valeur expérimentale de B. Le pourcentage d’occupation observé pour l’encapsulation à 0,11 Bac/capsule est de 17 %. Il correspond à une concentration moyenne réelle de 0,19 Bac/capsule. Cette concentration correspond à un facteur de proportionnalité entre le Δ d.o. et la concentration de $7.10^8 \text{ Bac.mL}^{-1} \cdot (\text{u.d.o})^{-1}$. La valeur de B ($4.10^8 \text{ Bac.mL}^{-1} \cdot (\text{u.d.o})^{-1}$) utilisée précédemment semble donc être sous estimée.

En complément de cette observation, des tests de correspondance entre le Δ d.o mesuré et le nombre de colonies développées sur boîte d’agar ont été effectués. Ces tests permettent d’évaluer B à $6.10^8 \text{ Bac.mL}^{-1} \cdot (\text{u.d.o})^{-1}$ par unité de densité optique.

Dans la suite nous conservons la valeur de $4.10^8 \text{ Bac.mL}^{-1} \cdot (\text{u.d.o})^{-1}$ pour B, cependant nous garderons ces résultats en mémoire lors des futures interprétations.

Nous pouvons tout de même affirmer qu’il est possible d’encapsuler jusqu’à une bactérie par capsule afin d’observer le développement d’une colonie monoclonale dans un réservoir semi-confiné.

L’incertitude sur cette affirmation peut être évaluée. La loi de Poisson nous permet de calculer le pourcentage de colonies réellement issues de l’encapsulation d’une unique bactérie, $\%_{\text{mono}}$:

$$\text{Pour } \lambda = 0,19, \text{ on a } \%_{\text{mono}} = \frac{P(k=1)}{\sum_{j=1}^{\infty} P(j)} * 100 = 91 \% \quad (\text{IV.6})$$

Parmi les cultures des capsules occupées, 91 % sont donc des cultures monoclonales.

Après ces considérations liées au processus d’encapsulation, il est intéressant d’étudier la dynamique de croissance de ces cultures compartimentées.

IV.1.1.4 Suivi de la croissance de bactéries encapsulées

Il est possible de suivre la croissance en capsule par une mesure similaire à celle effectuée en solution. Pour cela, une trentaine de capsules sont fabriquées avec une concentration initiale en bactéries de 7.10^5 Bac.mL⁻¹ soit $1,4.10^4$ Bac/capsule. À intervalles réguliers, une capsule est prélevée du milieu de culture et détruite par compression à l'aide d'une spatule dans 1 mL de milieu LB. L'échantillon de mesure est passé au vortex pour redisperser la totalité des bactéries de la capsule dans la solution. Une mesure de d.o. permet alors de remonter à la concentration dans la capsule.

La figure IV.6 compare la croissance dans une capsule et en solution. Au début de la croissance, la dynamique est similaire dans les deux cas. Le temps de division en phase exponentielle dans les capsules est de 27 minutes. Cette phase est ensuite suivie d'une phase de ralentissement puis d'une phase stationnaire. La concentration en bactéries durant la phase stationnaire vaut 1.10^{10} Bac.mL⁻¹. On remarque que le temps de division de *E. coli* dans les capsules est similaire au temps de division de la bactérie en solution. La culture en capsule ne semble donc pas perturber la croissance de *E. coli*. La concentration en phase stationnaire est plus élevée que la concentration en solution. Cette différence est liée au confinement des bactéries dans la capsule.

Cependant nous ne pouvons pas discuter plus de la concentration en phase stationnaire car lors de ces expériences, les bains extérieurs ont été contaminés par *E. coli*. On constate ici une limite de la technique d'encapsulation. Lors de la création des capsules, la zone de détachement de la bigoutte et la création d'une goutte satellite offrent la possibilité aux bactéries de contaminer le bain de gélification. Dans le cas de concentrations bactériennes élevées dans le cœur de la bi-goutte, la probabilité de contamination du bain est grande. Cette contamination peut ensuite se propager dans le milieu de culture lors du transfert des capsules. Pour des bactéries à temps de division court comme *E. coli*, une seule bactérie suffit alors pour coloniser la totalité du milieu de culture en quelques heures et perturber la croissance dans les capsules.

Pour suivre la croissance, la concentration initiale utilisée est 10^5 fois plus élevée que celle de l'encapsulation monoclonale. Cette différence explique l'apparition de contamination dans les milieux de culture. Afin d'évaluer la concentration limite dans les capsules nous avons étudié des capsules monoclonales ne présentant pas de contamination extérieures. Au bout de 120 heures de culture, la concentration interne de la capsule atteint une valeur limite de l'ordre de 2.10^{11} Bac.mL⁻¹.

À de telles concentrations, nous pouvons nous interroger sur la viabilité des bactéries encapsulées. Le principal inconvénient de la mesure de concentration par turbidité est la comptabilisation des bactéries mortes. Afin de connaître la quantité réelle de bactéries vivantes, des bactéries issues de capsules en phase stationnaire sont étalées sur des boîtes d'agar de milieu LB. En comparant le nombre de colonies formées au nombre de bactéries étalées sur le gel, on obtient le pourcentage de bactéries capables de se diviser pour former une colonie. On parle alors d'unité formant une colonie (UFC).

Un comptage a été effectué sur 7 capsules provenant de 4 encapsulations non monoclonales

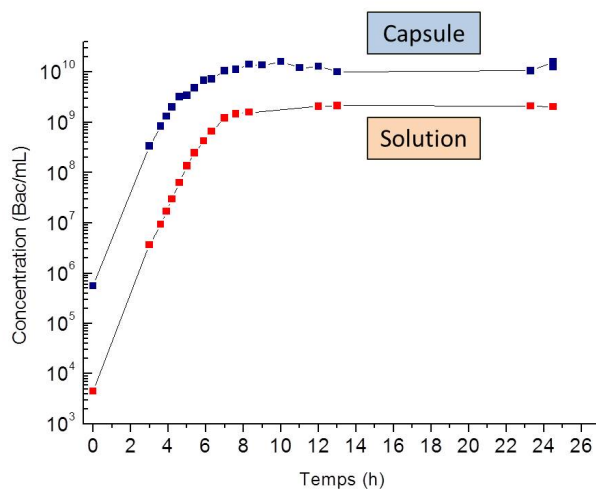


FIGURE IV.6 – Courbe de croissance d'une culture encapsulée de *E. coli*, inoculée à la concentration initiale de 7.10^5 Bac.mL⁻¹ (bleu). À titre de comparaison la courbe de croissance en solution est reportée en rouge.

différentes. Ces capsules, mises en culture pendant des temps compris entre 19 et 26 heures, contiennent en moyenne 93 % d'UFC. Un décompte similaire effectué sur des capsules monoclonales en culture depuis 120 heures a révélé une moyenne de 119 % d'UFC. Ces hauts pourcentages nous informent de la viabilité des bactéries encapsulées même à hautes concentrations. Ces chiffres doivent cependant être considérés avec précaution car ils ne prennent pas en compte la variabilité de B. En effet, durant la phase stationnaire, la taille des bactéries diminue et entraîne une variation de la valeur de B. Pour étudier plus précisément la proportion de bactéries vivantes en solution, il faudrait procéder à un marquage de type "live/dead" et compter les bactéries par cytométrie de flux.

Malgré une réserve presque infinie de nutriments, la concentration dans les capsules semble être limitée à des valeurs proches de 1.10^{11} Bac.mL⁻¹. Le paragraphe suivant explicite les facteurs pouvant limiter la croissance en capsules

IV.1.1.5 Les limites possibles de la croissance encapsulée

La loi de tolérance de Shelford énonce qu'il existe des limites dans les facteurs environnementaux au-dessous ou au-dessus desquelles un organisme ne peut pas survivre et se développer [117]. De manière générale, la croissance et la division bactérienne sont stoppées par le manque d'un nutriment essentiel au développement ou l'accumulation de déchets ou d'une molécule excrétée [103]. Ces facteurs sont des effets de concentration dans le milieu. Dans notre cas, les capsules sont des réservoirs de 20 μ L baignants dans un volume de milieu 200 à 1000 fois plus important. Dans ces réservoirs infinis, les limites liées à la concentration d'espèces ne semblent pas prépondérantes dans le cas de la culture de *E. coli* encapsulée dans le LB, milieu nutritif riche.

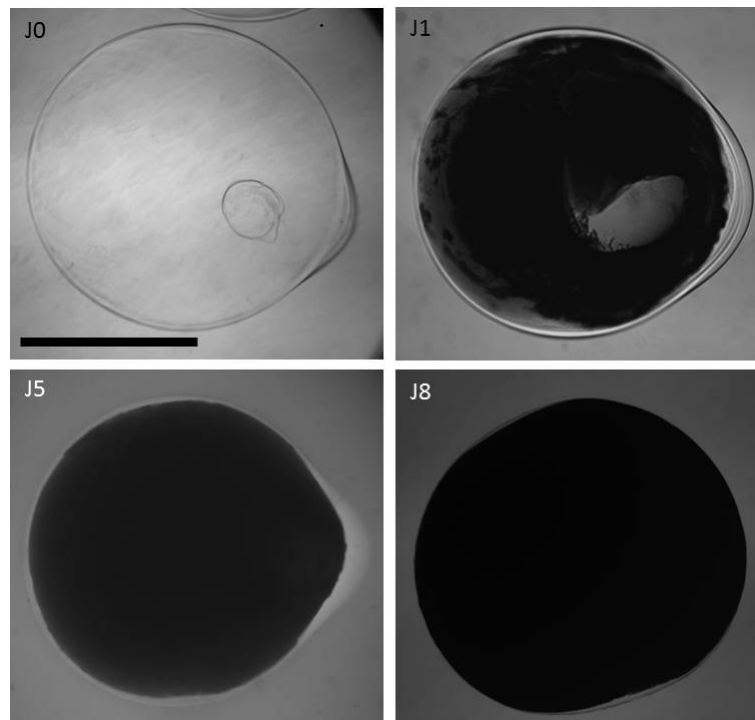


FIGURE IV.7 – Évolution de la morphologie de capsules contenant *E. coli* en fonction du nombre de jours de culture. Échelle : 1,5 mm.

Un facteur important à prendre en compte est la diffusion des nutriments au cœur de la capsule. Aux concentrations bactériennes élevées, la diffusion des nutriments jusqu'au centre du réservoir peut être ralentie. Ce phénomène entraînerait alors un arrêt de la croissance au centre de la capsule, voir une décroissance de la population. Ce problème de diffusion a déjà été reporté par Alessandri et al. [2], lors de la culture de cellules de tumeurs dans des capsules similaires. Ils constatent après plusieurs jours de croissance, une augmentation du taux de cellules mortes au centre de la capsule.

Cependant ce problème de diffusion ne concerne pas les bactéries en périphérie du cœur. Elles continuent donc leur croissance et leur division. Cette croissance peut entraîner une pression sur la membrane d'alginate et la déformer [2]. La figure IV.7 montre l'évolution d'une capsule contenant des bactéries *E. coli* entre 0 et 8 jours de culture. La membrane s'affine au fur et à mesure du temps sous la pression interne exercée par la culture en développement.

Dans leur étude sur l'encapsulation de cellules tumorales, Alessandri et al. [2] observent la pression de la tumeur en expansion sur la membrane, jusqu'à la rupture de celle-ci. Dans notre cas, la pression peut être constatée par la mesure du diamètre des capsules de la figure IV.7. Entre 0 et 8 jours de culture, le diamètre augmente de 10 %. Malgré cette pression, la rupture de la membrane n'a pas été observée lors de cultures de *E. coli* en capsule.

Afin d'étudier en détail les limites de la croissance de *E. coli*, l'utilisation d'un milieu différent du LB pourrait s'avérer intéressante. Un milieu contrôlé en nutriments permettrait de corréler la croissance avec l'apport en substrat. L'influence de la quantité de substrats et des déchets pourrait alors être explorée. Il serait également intéressant de marquer les bactéries

vivantes et mortes et d'imager la capsule en 3 dimensions afin de connaître la répartition spatiale des bactéries suivant leur état. Des premières mesures en microscopie confocale ont été entreprises dans ce but, mais la densité bactérienne ne permet que l'observation des couches extérieures du cœur de la capsule.

La technique de fabrication de capsule à cœur liquide développée au LCMD permet donc l'encapsulation et la culture de micro-organismes. Elle permet d'isoler de manière contrôlée jusqu'à une bactérie par réservoir. La croissance dans ces compartiments suit une dynamique similaire à celle de la croissance en solution. Pour *E. coli*, la culture encapsulée à potentiel chimique constant permet l'obtention de concentrations bactériennes en phase stationnaire 10 à 100 fois supérieures à celle obtenue en solution.

Après l'étude de cette bactérie modèle, nous allons nous intéresser à la culture d'un organisme électroactif *Geobacter sulfurreducens*. Nous présentons ici sa culture en solution et en capsule.

IV.1.2 Étude de la croissance encapsulée de *Geobacter sulfurreducens*

Geobacter sulfurreducens est la bactérie électroactive présentée au chapitre I. Elle est capable de convertir un substrat organique en courant électrique par l'intermédiaire d'une électrode solide sous potentiel.

IV.1.2.1 La culture de *G. sulfurreducens*

Dans notre étude, la souche de *G. sulfurreducens* utilisée est la souche PCA fournie par DMSZ (référéncée DSM 12127). Son milieu nutritif est réalisé selon le protocole 826 *Geobacter medium* de DMSZ (milieu 826) dont la formulation est détaillée en Annexe C. Ce milieu comporte les éléments essentiels à la croissance et à la division bactérienne. La source de carbone utilisée est l'acétate de sodium. Le fumarate de sodium est l'accepteur soluble qui permet l'externalisation des électrons générés par *G. sulfurreducens*. Le milieu est formulé à pH 7. Une culture est initiée par dilution d'une culture mère dans du milieu vierge. *G. sulfurreducens* étant une bactérie anaérobie, les cultures sont effectuées dans des tubes de type hungate, fermés par un septum en caoutchouc butyle étanche au gaz. Avant incubation, l'oxygène est chassé des milieux par bullage d'un mélange de N₂ + CO₂ (80 %/20 %). La culture est incubée à 30 ° C sous agitation orbitale.

La bactérie *G. sulfurreducens* est identifiable par sa couleur rouge caractéristique. La figure IV.8 A présente une culture sur une boîte d'agar/milieu 826. Les colonies sont rondes et d'une teinte rouge visible à l'œil, et détectable par spectroscopie UV-visible. La figure IV.8 compare le spectre d'absorption du milieu 826 et celui de *G. sulfurreducens*. La couleur rouge de la culture se distingue par un pic d'absorption autour de 400 nm. Cette teinte est liée à la présence de cytochromes C contenant des ions Fe(III) sur la membrane des bactéries.

IV.1.2.2 Croissance de *G. sulfurreducens* en solution

Comme pour *E. coli*, on suit la croissance de *G. Sulfurreducens*. La concentration en solution de *G. Sulfurreducens* est estimée à partir du $\Delta(d.o)$ mesuré à 600 nm et du facteur B

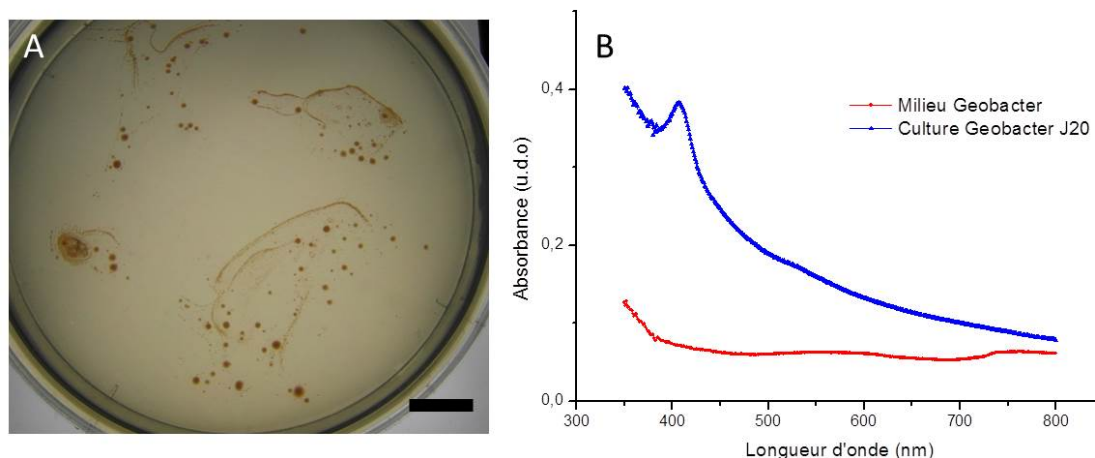


FIGURE IV.8 – (A) Colonies de *G. sulfurreducens* sur une boîte d'agar/milieu 826. Échelle : 1 cm. (B) Spectre d'absorption de *G. sulfurreducens* entre 350 et 800 nm.

présenté précédemment.

La figure IV.9 représente la croissance d'une culture de *G. sulfurreducens* sous atmosphère anaérobie dans le milieu 826, à 30 ° C sous agitation (courbe rouge). Comme pour *E. coli*, une phase de croissance exponentielle est observée. Le temps de division durant cette phase est estimé à 10 heures. La culture atteint ensuite une phase stationnaire. La concentration est alors de l'ordre de 6.10^7 Bac.mL⁻¹.

IV.1.2.3 Encapsulation et croissance de *G. sulfurreducens*

Par un protocole similaire à celui utilisé pour *E. coli*, *G. sulfurreducens* est encapsulée dans une capsule à membrane d'alginate. *G. sulfurreducens* étant moins robuste que *E. coli*, l'encapsulation est suivie d'une étape de lavage d'une heure dans du milieu 826 afin d'éliminer le PEG et le SDS présents dans la formulation de la capsule. Les capsules sont ensuite mises en culture à 30 ° C dans un volume 50 fois supérieur à leur propre volume dans du milieu 826 dégazé additionné de 0,1 mmol.L⁻¹ de BaCl₂. On a donc :

$$V_{\text{milieu}} = 50 * n * V_{\text{capsule}} \quad (\text{IV.7})$$

avec n le nombre de capsules mises en culture, V_{capsule} le volume du cœur d'une capsule (20 μL), et V_{milieu} le volume de milieu baignant les capsules.

La figure IV.9 représente la croissance d'une culture de *G. sulfurreducens* encapsulée (courbe orange). Le temps de division en phase exponentielle est estimé à 11 heures entre 0 et 2,5 jours. La croissance en capsule suit donc la même dynamique que la croissance en solution. La concentration atteinte en phase stationnaire est de $3,5.10^9$ Bac.mL⁻¹. Comme pour *E. coli*, la concentration en capsule est donc plus élevée que lors d'une culture en solution. Cependant la concentration reste inférieure à la concentration mesurée pour les cultures de *E.*

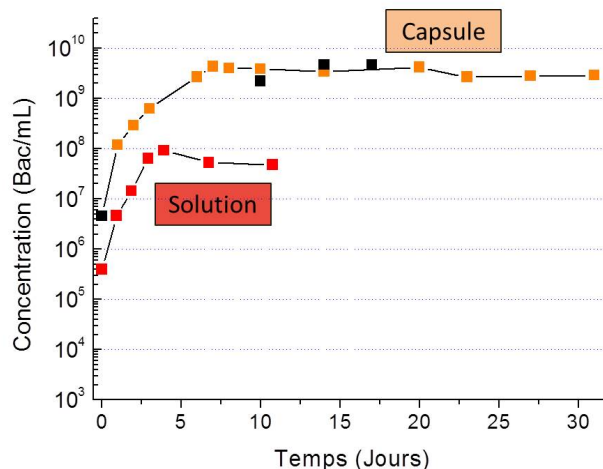


FIGURE IV.9 – Courbe de croissance d’une culture de *G. sulfurreducens* en solution (rouge, $C_{t_0} = 4.10^5$ Bac.mL⁻¹) et encapsulées (orange, $C_{t_0} = 4.6.10^6$ Bac.mL⁻¹). Les points noirs représentent les concentrations obtenues pour des cultures dans des capsules à membrane Alg/MWNT-Brij35.

coli encapsulées. Pour l’encapsulation de *G. sulfurreducens*, nous n’avons pas observé de cas de contaminations du milieu de culture.

La comparaison entre les concentrations en solution et en capsule donne un rapport de l’ordre de 60. Cet ordre de grandeur est similaire au facteur de dilution des capsules dans leur milieu de culture. Cela nous invite à penser que le plateau observé pour la culture en capsule est lié à une carence en acétate, la source carbonée du milieu. Ce constat peut être vérifié par un renouvellement du milieu de culture. Les photos de la figure IV.10 montrent les capsules à deux stades de culture différents. La figure IV.10 (A) est une photo de capsules en phase stationnaire à 8 jours de culture. On peut remarquer l’adhésion des bactéries à la membrane d’hydrogel. Ce phénomène est encourageant dans l’optique de notre application. Cette adhésion devrait améliorer le contact électrique entre la bactérie et la membrane d’hydrogel conducteur. La figure IV.10 (B) est une photo de capsules à 20 jours de culture dans un milieu renouvelé au dixième jour. Elle permet de constater visuellement l’augmentation de la concentration en bactéries lors du renouvellement du milieu de culture. La concentration dans la capsule augmente alors pour atteindre des concentrations autour de 1.10^{10} Bac.mL⁻¹. Ici, la carence en acétate était donc bien le facteur limitant la croissance.

IV.1.2.4 Encapsulation et croissance de *G. sulfurreducens* dans une capsule à membrane conductrice

Le mélange utilisé pour l’encapsulation par une membrane conductrice est composé de 1,5 % d’alginate, 1,5 % de MWNT-Brij35 et 1 mmol.L⁻¹ de SDS. Le protocole d’encapsulation et de culture de *G. sulfurreducens* est le même que dans le cas d’une capsule sans MWNT. Les capsules sont réalisées avec un débit de cœur de 5 mL.h⁻¹ et un débit de coque de 3 mL.h⁻¹. Le volume du cœur des capsules vaut alors 18 μ L. Afin d’optimiser la dialyse du Brij35 et la

IV.1. Étude de la croissance bactérienne compartimentée

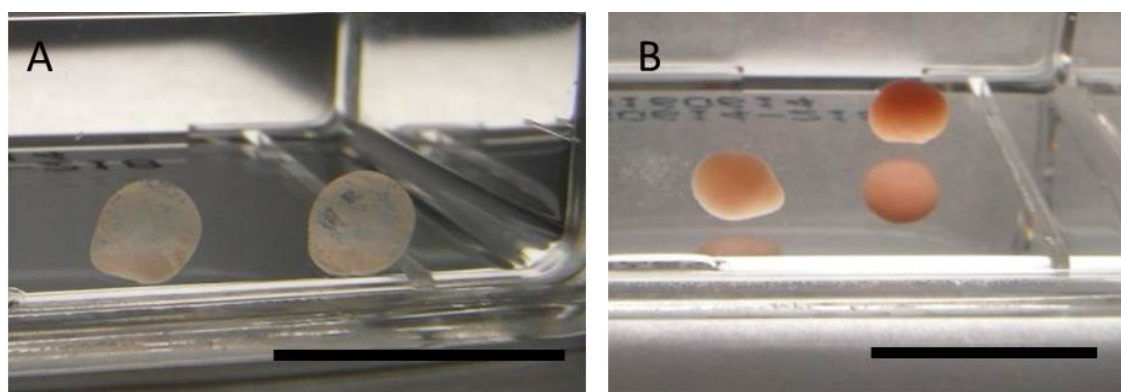


FIGURE IV.10 – Capsules à cœur liquide et à membrane d’alginate contenant *G. sulfurreducens* en culture. (A) Culture après 8 jours d’incubation. (B) Culture après 20 jours d’incubation et un renouvellement de milieu au bout de 10 jours. Échelle : 1 cm.

connexion des nanotubes dans la membrane, le milieu 826 baignant les capsules est renouvelé après 12 heures de culture.

La croissance dans les capsules à membrane conductrice est similaire à celle observée dans les capsules simples. Les points noirs du graphique IV.9 représentent la concentration bactérienne dans des capsules à membrane conductrice. À même concentration initiale, la concentration en phase stationnaire est identique pour toutes les capsules, conductrices ou non, au bout de 10 jours d’incubation.

Il est donc possible d’encapsuler et faire croître *G. sulfurreducens* dans des capsules à cœur liquide et membrane conductrice. Ce résultat est une preuve de la biocompatibilité de notre procédé d’encapsulation par une membrane conductrice.

Il faut à présent vérifier que l’hydrogel formulé peut être le support de l’activité électrique de bactéries. Lorsqu’il est connecté électriquement, l’hydrogel conducteur doit permettre l’adhésion des bactéries et doit pouvoir faire transiter les électrons externalisés par les bactéries électroactives.

Pour des raisons pratiques liées à la manipulation et l’observation, des billes pleines ont été utilisées dans un premier temps pour valider cette étape. Ces billes sont fabriquées selon le protocole présenté à la partie II.2.4.

Dans la suite nous étudions donc le cas de billes Alg/MWNT sous potentiel en présence de bactéries électroactives *G. sulfurreducens* en solution. Cette étude peut être comparée aux travaux publiés par Bond et Lovley [16] et présentés dans le chapitre introductif (I.1.2.2).

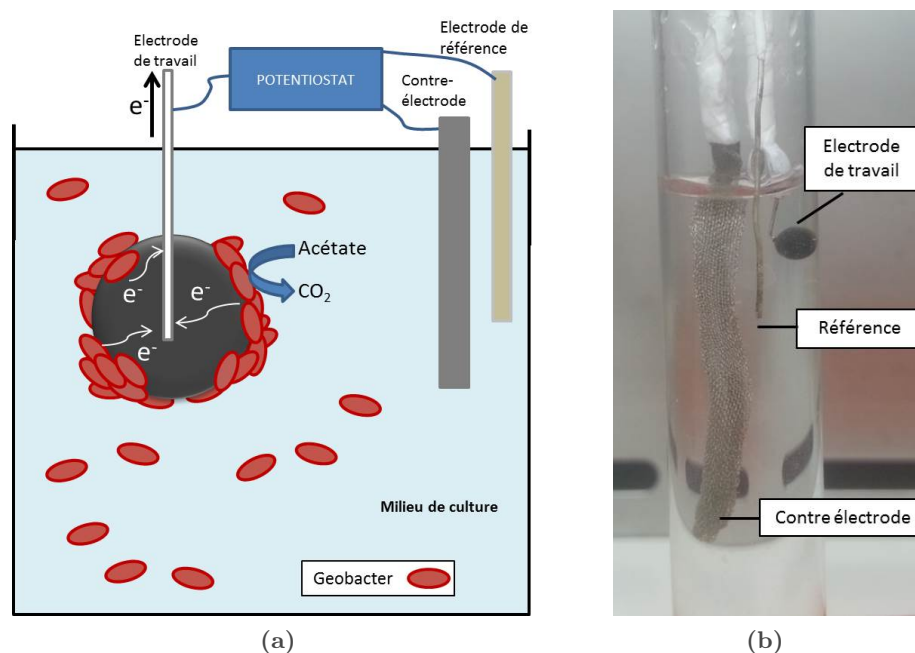


FIGURE IV.11 – Schéma (a) et photo (b) du système d'électrodes permettant la connexion et l'étude de l'hydrogel Alg/MWNT comme une électrode macroscopique support de l'oxydation de l'acétate par *G. sulfurreducens*. Le milieu de culture ne contient pas de fumarate. L'ensemble du dispositif est enfermé dans une tube hermétique aux gaz.

IV.2 Production d'un courant électrique par *G. sulfurreducens* attachée à une électrode composite Alg/MWNT

IV.2.1 Dispositif de connexion électrique et de mesure de courant

Nous souhaitons mesurer l'activité électrique de *G. sulfurreducens* via une électrode d'hydrogel Alg/MWNT connectée. Cette mesure s'effectue à l'aide d'un système de trois électrodes : une bille conductrice connectée par un fil de platine (électrode de travail), une contre électrode en grille de platine et une électrode de référence au chlorure d'argent (figure IV.11(b)). Ces trois électrodes sont reliées à un potentiostat permettant d'effectuer des mesures de voltampérométrie cyclique et de chronoampérométrie.

L'expérience de mesure d'électroactivité bactérienne est schématisée sur la figure IV.11(a). L'électrode d'hydrogel est utilisée comme accepteur d'électron lors de l'oxydation de l'acétate en CO_2 par les bactéries. Pour pouvoir récupérer des électrons via l'électrode, il est nécessaire d'éliminer le fumarate du milieu de culture. Pour cela, une culture de *G. sulfurreducens* est centrifugée à 2700 *g* pendant 45 minutes. Le surnageant est alors remplacé par du milieu de culture ne contenant pas de fumarate (milieu 826(-)). L'échantillon est agité puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Les bactéries du culot sont ensuite injectées dans le milieu 826(-) baignant les trois électrodes. Ces lavages successifs permettent d'éliminer efficacement le fumarate de la solution de bactéries injectée dans le tube de l'expérience.

Afin de conserver une atmosphère anaérobie, l'expérience est effectuée dans un tube hungate

IV.2. Production d'un courant électrique par *G. sulfurreducens* attachée à une électrode composite Alg/MWNT

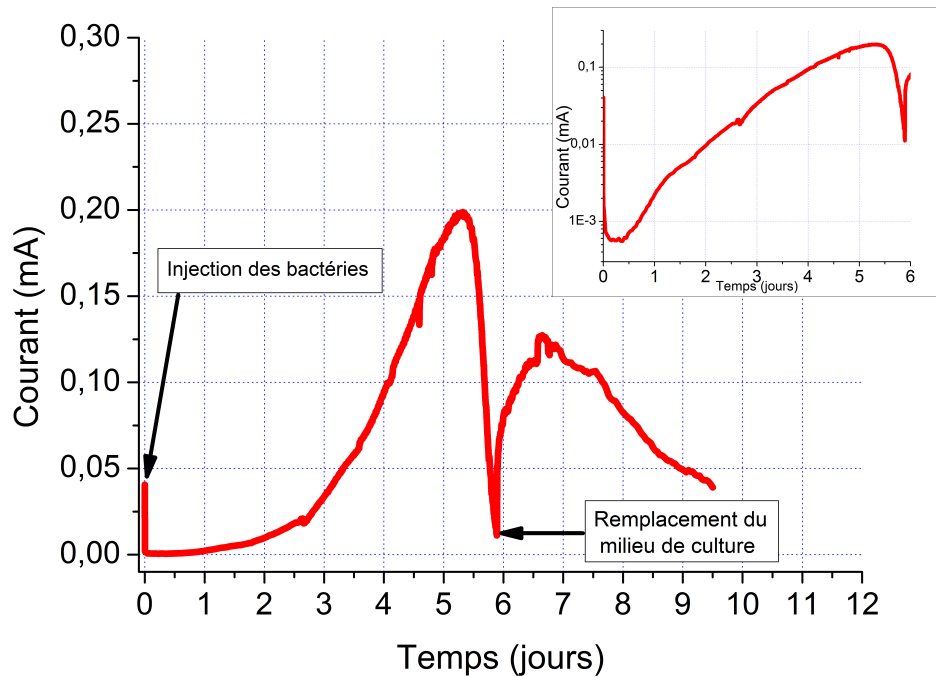


FIGURE IV.12 – Évolution temporelle du courant généré par un biofilm de *G. sulfurreducens* sur une bille connectée Alg 1%/MWNT 2%. Encadré : Évolution du courant en représentation logarithmique.

(figure IV.11(b)). Les électrodes sont connectées à travers le septum du tube. Le tube est plongé dans un bain à 25 ° C et placé sous agitation magnétique légère afin d'éviter la sédimentation des bactéries.

Après l'inoculation des bactéries dans le milieu, l'électrode de travail est portée à un potentiel fixe de 0,4 V. Le courant mesuré à l'électrode de travail est suivi en fonction du temps.

IV.2.2 Courant généré par *G. sulfurreducens*

La figure IV.12 présente le courant mesuré en fonction du temps avec une bille Alg 1%/MWNT 2% en présence de *G. sulfurreducens*.

Le courant initialement très bas ($\sim 0,5 \mu\text{A}$) augmente jusqu'à 0,2 mA au bout de 5 jours d'incubation. Le courant obtenu résulte de l'activité métabolique des bactéries. En oxydant l'acétate, elles externalisent des électrons qui sont récupérés par la bille conductrice. La courbe obtenue sur les 5 premiers jours est comparable à l'évolution du courant obtenue par Bond et Lovley [16] présentée dans le premier chapitre de ce manuscrit (voir figure I.4(a)). Dans notre expérience, on peut constater au bout de plusieurs jours le développement d'un biofilm à la surface de la bille connectée. Ce biofilm résulte de l'adhésion et du développement des bactéries sur l'hydrogel. Ce biofilm est assez épais pour être observé à l'œil comme le montrent les photos de la figure IV.13 A. Sur les photos, on retrouve la couleur rouge caractéristique de *G. sulfurreducens*.

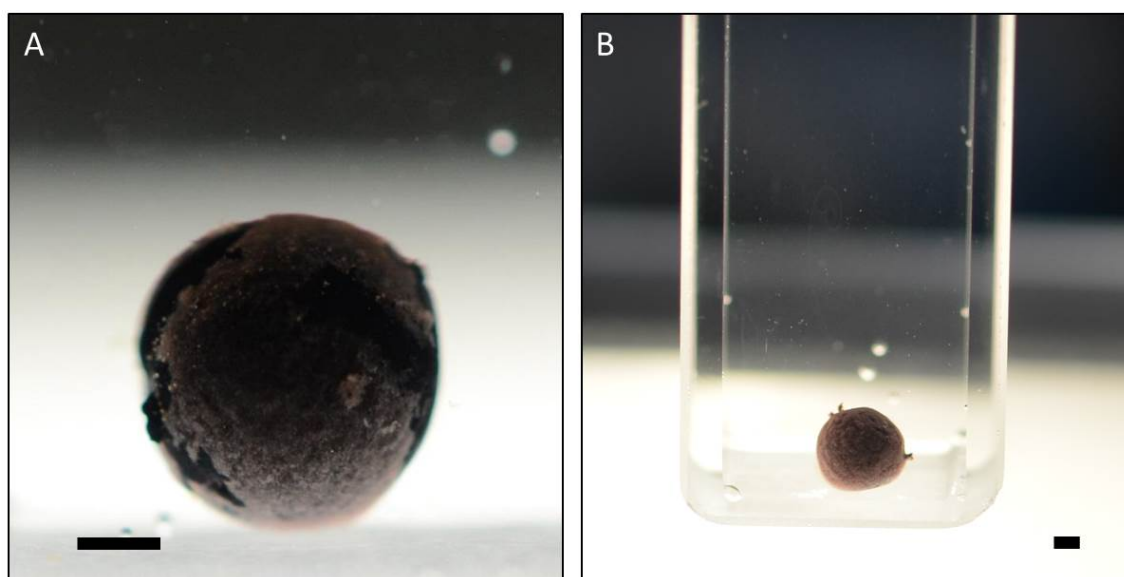


FIGURE IV.13 – (A) Biofilm de *G. sulfurreducens* développé sur une bille Alg 1%/MWNT 2% mise sous potentiel pendant 10 jours. (B) Biofilm de *G. sulfurreducens* développé sur une bille Alg 1%/MWNT 1,5% mise sous potentiel pendant 5 jours. Échelles : 1 mm.

Au bout de 5 jours et demi, le courant décroît fortement. En renouvelant le milieu de culture, le courant ré-augmente immédiatement. Sa valeur est du même ordre de grandeur que celle mesurée avant la chute (voir figure IV.12). La différence de courant observée au moment du remplacement du milieu est certainement liée à une destruction partielle du biofilm. Le changement du milieu nécessite un bullage afin de remettre le dispositif de mesure sous atmosphère anaérobie. Durant ce bullage, nous avons constaté un détachement de morceaux de biofilms par impact des bulles sur la bille. Comme on peut l'observer sur la figure IV.13 A, certaines zones de la bille ne sont alors plus recouvertes de biofilm.

Compte tenu de cette observation, nous pouvons affirmer que le courant observé, avant et après la chute, est uniquement généré par le biofilm bactérien développé sur la bille. Les bactéries non adsorbées n'ont pas de contribution électroactive. La ré-augmentation du courant est en accord avec les travaux de Bond et Lovley [16]. *G. sulfurreducens* ne sécrète pas de médiateur red/ox soluble. Le transfert d'électrons s'effectue donc uniquement par contact physique.

Sur la figure IV.12, la représentation logarithmique du courant révèle une croissance exponentielle en fonction du temps. Cette évolution témoigne de la division à temps constant des bactéries électroactives du biofilm adsorbé à la surface de la bille. Si l'on admet que le courant est proportionnel au nombre de bactéries, on peut calculer un temps de division dans le biofilm. Il est de l'ordre de 14 heures entre 1 et 4 jours d'incubation. On trouve ici un temps légèrement plus élevé que le temps de division observé en solution en présence de fumarate (10 heures).

Les densités de courant mesurées peuvent être obtenues par simple division du courant mesuré par la surface de la bille (38 mm²).

La connexion d'une bille Alg 1%/MWNT 2% en présence de *G. sulfurreducens* a été réalisée

IV.2. Production d'un courant électrique par *G. sulfurreducens* attachée à une électrode composite Alg/MWNT

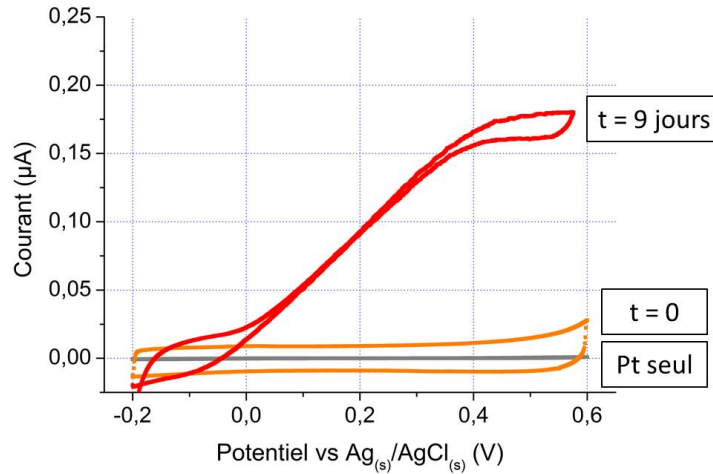


FIGURE IV.14 – Voltampérométries cycliques effectuées sur un biofilm de *G. sulfurreducens* développé sur une bille Alg 1%/MWNT 1,5% au bout de 9 jours d'incubation (rouge). Pour comparaison des CV effectuées à $t = 0$ sans la bille connectée sont présentées respectivement en orange et gris. Vitesse de balayage $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

deux fois. Les densités de courant maximales obtenues sont $5 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ et $7 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$.

La connexion d'une bille Alg 1%/MWNT 1,5% a permis l'obtention d'une densité de courant de $4,4 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$. Le biofilm obtenu à la fin de l'expérience couvre la totalité de l'hydrogel comme le montre la photo IV.13 B.

Enfin nous avons utilisé une bille Alg 1,5%/MWNT 1,5% dont la composition est celle de la membrane conductrice des capsules utilisées précédemment pour l'encapsulation de *G. sulfurreducens*. Cette bille a permis l'obtention d'une densité de courant de $2,4 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$.

Les densités de courant obtenues sont similaires les valeurs obtenues dans des études utilisant du papier carbone comme électrode support de l'électroactivité de *G. sulfurreducens* [95]. On observe logiquement que la densité de courant maximale obtenue diminue lorsque le pourcentage de nanotubes diminue et lorsque le pourcentage d'alginate augmente. Malgré une conductivité très inférieure au papier carbone ($2,4\cdot 10^4 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ contre $0,1 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$), l'hydrogel composite conducteur est donc aussi performant en terme de récupération d'électrons.

Il est également possible de sonder l'électroactivité du biofilm par voltampérométrie cyclique [121][38][75]. La figure IV.14 présente une CV effectuée sur un biofilm développé sur une bille Alg 1%/MWNT 1,5% au bout de 9 jours de culture. La forme sigmoïde du cycle indique une transition de type red/ox. Elle correspond certainement au signal électrochimique des cytochromes C du biofilm [60][85]. Le cycle comporte un plateau en courant pour les potentiels supérieurs à 0,4 V. Ce plateau indique que le transfert électronique n'est pas limité par le contact entre les bactéries et l'hydrogel mais par les processus électrochimiques internes de la bactérie.

Les résultats présentés ici démontrent que l'hydrogel Alg/MWNT permet l'adhésion des bactéries électroactives sous forme d'un biofilm et l'extraction des électrons générés. De plus,

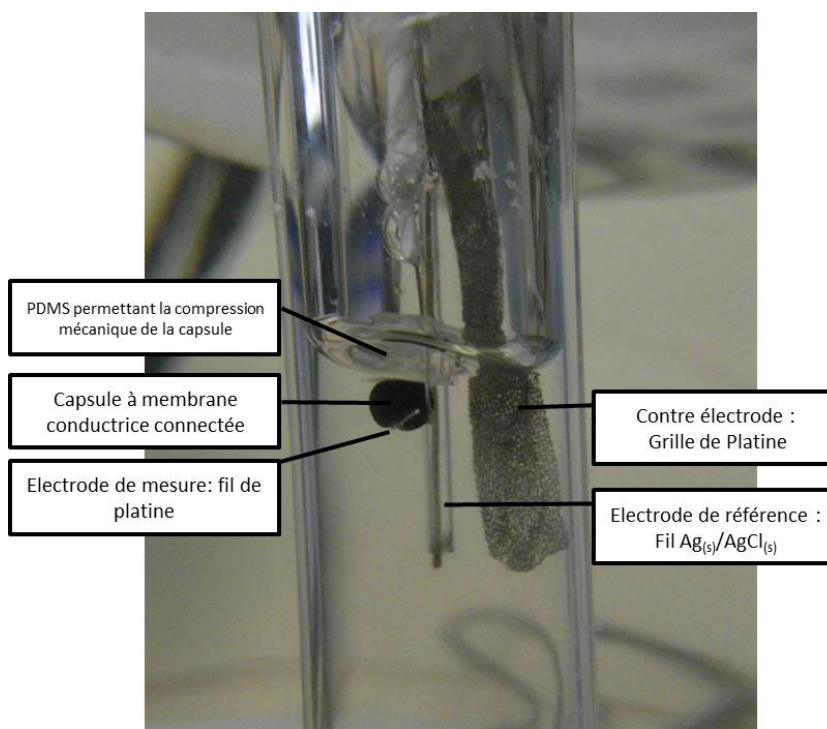


FIGURE IV.15 – Photo du système de 3 électrodes dans un tube hermétique au gaz permettant la connexion électrique d'une capsule.

il est possible de véhiculer des électrons dans le réseau de MWNT sur une distance avoisinant le rayon d'un bille Alg/MWNT soit environ 1 millimètres.

Il convient à présent de connecter une capsule à membrane conductrice contenant des bactéries électroactives afin d'utiliser la membrane comme une anode et sonder l'activité électrique de la population encapsulée.

IV.3 La capsule "anode", un outil compartimenté pour sonder l'électroactivité bactérienne

IV.3.1 Dispositif de connexion d'une capsule à membrane conductrice

Pour mettre la membrane de la capsule sous potentiel, il est nécessaire de la connecter électriquement à un fil de platine.

Contrairement à une bille, la capsule ne peut pas être traversée par un fil. Elle n'est pas assez résistante mécaniquement et serait détruite. La membrane est trop fine ($\sim 200 \mu m$) pour envisager raisonnablement de planter un fil dans la coque de la capsule.

Nous avons donc choisi de connecter la capsule par un contact extérieur entre la membrane et un fil de platine sous potentiel par une légère compression mécanique. La photo de la figure IV.15 présente le système de connexion. Une cale en PDMS permet garder la capsule en contact intime avec le fil de platine.

IV.3. La capsule "anode", un outil compartimenté pour sonder l'électroactivité bactérienne

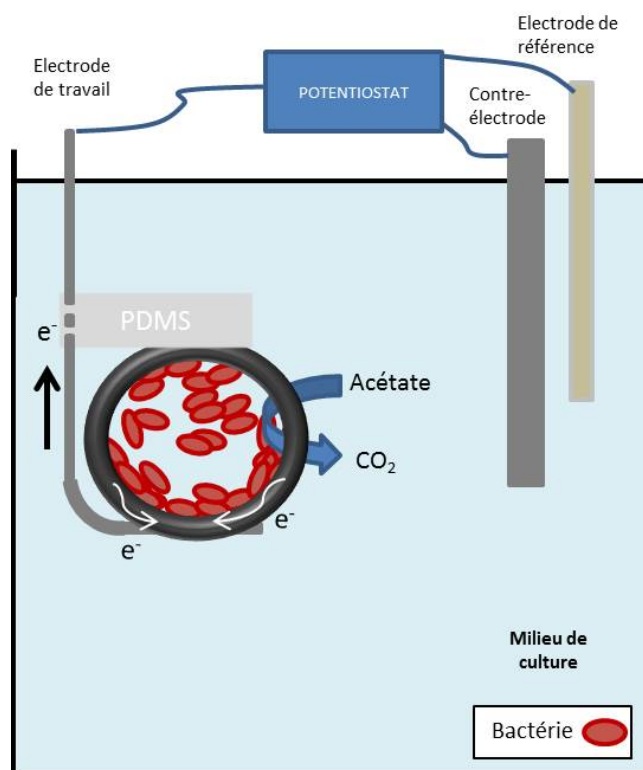


FIGURE IV.16 – Schéma d'une capsule sous potentiel contenant *G. Sulfurreducens*. La capsule est connectée par contact avec un fil de platine. L'ensemble est plongé dans un milieu de culture contenant de l'acétate de sodium.

Le schéma de la figure IV.16 expose le principe de mesure de l'électroactivité d'une population bactérienne encapsulée. En oxydant de l'acétate, les bactéries génèrent des électrons. Elles peuvent ensuite transférer ces électrons à un substrat solide sous potentiel : la membrane de la capsule. Avec l'aide d'un potentiostat, il est possible de suivre l'activité électrique de la population encapsulée en fonction du temps.

IV.3.2 Mesure de l'électroactivité d'une population de *G. sulfurreducens* encapsulée

G. sulfurreducens est encapsulée à la concentration de $3 \cdot 10^5$ Bac/capsule par un mélange Alg 1,5%/MWNT 1,5%-Brij35/SDS 1mM. Les débits utilisés sont $5 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le fluide de cœur et de $4 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le fluide de coque. Le volume du cœur des capsules vaut alors $16 \mu\text{L}$. Les capsules sont mises en culture dans du milieu 826 complet afin de permettre la dialyse des tensioactifs et la connexion du réseau de MWNT dans la membrane. Après 7 jours, une capsule est prélevée et lavée pendant 2 heures dans 15 mL de milieu 826(-) afin de dialyser le fumarate présent dans la capsule. Elle est ensuite positionnée dans le système de connexion. L'ensemble est mis sous atmosphère anaérobie dans du milieu 826(-) à 25°C . L'électrode de mesure est mise sous potentiel à $0,4 \text{ V}$ et le courant est suivi en fonction du temps grâce au potentiostat.

La figure IV.17 montre l'évolution de l'électroactivité de la population *G. sulfurreducens*

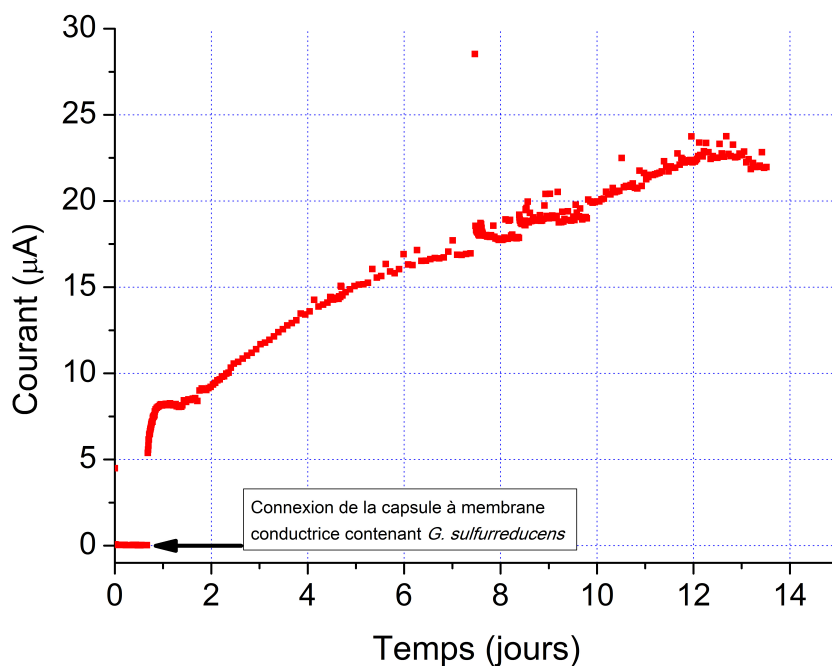


FIGURE IV.17 – Évolution temporelle de la densité de courant générée par *G. sulfurreducens* dans une capsule à membrane conductrice connectée.

encapsulée.

Sans capsule, la densité de courant mesurée est de $2,7 \cdot 10^{-8}$ A. À la connexion, le courant se stabilise rapidement à $8,1 \cdot 10^{-6}$ A. Cette augmentation témoigne certainement de l'adhésion préalable des bactéries sur la surface intérieure de la membrane. La mise sous potentiel de la capsule permet immédiatement aux bactéries adsorbées de transférer des électrons à l'électrode *via* le réseau de nanotubes de carbone. Le courant augmente ensuite pendant 11 jours jusqu'à $21,6 \cdot 10^{-6}$ A. Afin de comparer le courant obtenu aux expériences précédentes, on peut convertir le courant en densité de courant. La surface utilisée pour cette conversion est une estimation de la surface intérieure de la membrane obtenue à partir du volume du cœur (31 mm^2). La densité de courant maximale obtenue est de $0,7 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$. On peut constater que la densité de courant observée est moindre par rapport celle mesurée avec des biofilms développés sur une billes Alg 1,5%/MWNT 1,5% ($2,4 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$). Cette différence provient peut être du type de connexion utilisé dans les deux cas. Ici nous utilisons une connexion par contact que l'on peut comparer à la connexion d'un fil "planté" utilisée dans le paragraphe précédent. La qualité de la connexion peut être estimée par voltampérométrie cyclique dans une solution de ferrocène méthanol. Deux CV sont effectuées avec une même bille Alg 1,5%/MWNT 1,5% dans les deux configurations, "contact" ou "plantée". Le courant maximum d'oxydation obtenu en connexion "plantée" se révèle 2,5 fois plus élevé que celui de la connexion par "contact". La connexion par "contact" utilisée ici est moins efficace que celle des billes "plantées" du paragraphe précédent. En conséquence, la surface mise sous potentiel est certainement plus faible dans le cas d'une

connexion par "contact". On peut donc affirmer que la différence observée est principalement due au système de connexion. Le contact que nous utilisons pour connecter les capsules est perfectible. Il faudrait pour cela utiliser une surface de connexion plus large qu'un simple fil de platine.

IV.4 Conclusion

Dans ce chapitre, une étude de la croissance de bactéries dans les capsules a montré que ces objets permettent la culture compartimentée et parallélisée de micro-organismes. En s'appuyant au départ sur une bactérie modèle, nous avons ensuite montré que cette technique est applicable à la culture d'autres bactéries et micro-organismes comme *G. sulfurreducens*. Enfin, l'ajout d'une propriété de conduction électrique à la membrane ne semble pas perturber la croissance des micro-organismes. Nous prouvons par cette étude, la biocompatibilité de notre procédé d'encapsulation par une membrane d'hydrogel conducteur.

Nous avons ensuite montré que l'hydrogel conducteur Alg/MWNT peut être utilisé comme électrode dans des applications de microbiologie. Connecté électriquement, il permet la récupération d'électrons produits par un biofilm bactérien développé à sa surface. Ses performances en courant sont similaires au papier carbone communément utilisé dans le domaine des piles à bactéries.

Enfin la mise sous potentiel de capsules contenant *G. sulfurreducens* a prouvé qu'il est possible de sonder l'électroactivité de bactéries isolées dans ces compartiments semi-perméables. Certes le système de mesure est perfectible, mais cette étude ouvre la voie à de nombreuses perspectives portant sur le développement et l'amélioration des piles à bactéries. Ces perspectives sont développées dans la conclusion générale de ces travaux de thèses.

Conclusion générale et perspectives d'utilisation de la capsule à membrane conductrice

Il est reconnu aujourd'hui par la communauté scientifique que la production d'énergie par des micro-organismes est une voie d'avenir qu'il est nécessaire d'explorer avec les technologies les plus avancées. Les piles bactériennes constituent une solution prometteuse pour la conversion de matières organiques en électricité.

Dans le chapitre introductif de ce manuscrit nous avons vu que le développement de cette technologie s'articule autour de plusieurs axes majeurs. L'amélioration des rendements de piles microbiennes est possible grâce au développement de structures d'électrodes innovantes et de nouvelles architectures de chambres anodique et cathodique. D'un point de vue biologique, la compréhension des métabolismes bactériens et des effets de collaboration, ainsi que la découverte de nouveaux micro-organismes électroactifs représentent les voies de progrès des MFC.

Afin d'explorer ces voies d'amélioration, il est nécessaire de développer de nouveaux dispositifs d'étude. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à créer un outil permettant de compartimenter et d'étudier l'électroactivité de bactéries. En s'appuyant sur une technologie présente au laboratoire, cette outil peut être fabriqué en série sous la forme d'une capsule à cœur liquide et à membrane d'hydrogel possédant des propriétés de conduction électrique.

Le challenge principal de ces travaux de thèse reposait donc sur la formulation d'un hydrogel biocompatible conducteur permettant de créer des capsules à cœur liquide.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit détaille la formulation d'un tel matériau. Ce dernier se compose de deux phases : l'hydrogel d'alginate et une phase solide de nanotubes de carbone, dispersés à l'aide un tensio-actif. Par impédancemétrie, nous avons constaté un seuil de percolation électrique à 0,6% en masse de nanotubes. Le matériau composite possède alors une conductivité de l'ordre de $0,1 \text{ S.m}^{-1}$. Nous avons également montré que l'étape de dialyse du tensio-actif permet la connexion électrique entre les nanotubes.

Le chapitre suivant présente la caractérisation de notre hydrogel composite conducteur par des mesures électrochimiques. Nous avons montré que cette hydrogel peut être connecté électriquement et se comporter comme une électrode macroscopique poreuse. Nous avons suivi dans le temps la création du réseau de nanotubes dans l'hydrogel en le connectant

électriquement. Cette étude macroscopique a été complétée par l'analyse de l'hydrogel aux petites échelles grâce à la microscopie électrochimique. Nous avons observé microscopiquement la cinétique de connexion du réseau conducteur. Même localement, le temps caractéristique de connexion des nanotubes est plus long que le temps de diffusion du tensio-actif sur une distance caractéristique du système. D'autres phénomènes comme la dynamique d'adsorption/désorption du tensio-actif sur les nanotubes sont donc limitants dans création du réseau conducteur.

Dans une dernière partie, nous démontrons enfin que la capsule à cœur liquide permet l'échantillonnage et l'étude de la croissance de populations bactériennes. Dans ces réservoirs, les vitesses de croissance sont similaires à celles observées en solution mais les concentrations en phase stationnaire obtenues sont plus élevées. Cette différence est liée à la suppression des effets de concentration par l'imposition d'un potentiel chimique constant. La technique de fabrication des capsules autorise l'encapsulation d'un nombre contrôlé de bactéries par capsule. Nous démontrons dans cette étude que ce nombre peut être abaissé jusqu'à une bactérie par capsule afin d'observer la croissance de colonies monoclonales. La modification de la membrane pour lui conférer la propriété de conduction électrique ne semble pas perturber la croissance des bactéries dans ces réservoirs biocompatibles.

Des billes d'hydrogel Alg/MWNT ont ensuite été utilisées comme électrodes support de l'activité électrique de bactéries. Nous avons démontré à cette occasion la biocompatibilité de notre matériau et surtout sa capacité à faire transiter des électrons externalisés par une bactérie. Malgré une conductivité faible, l'hydrogel composite alginate/nanotube de carbone se révèle aussi efficace que du papier carbone en terme de récupération d'électrons. Cette hydrogel modifié est donc parfaitement adapté à la réalisation de notre outil : une capsule à cœur liquide et à membrane conductrice.

Enfin nous avons présenté la preuve de concept de notre outil en encapsulant des bactéries électroactives dans une capsule à membrane conductrice. Cette capsule a ensuite été connectée électriquement afin de sonder l'électroactivité de la population encapsulée.

Cette capsule biocompatible à membrane conductrice constitue la brique élémentaire de projets futurs. La création au goutte à goutte de ces compartiments permet une fabrication en série à une fréquence de l'ordre 0,1 Hz. Ces réservoirs pourront être utilisés dans divers buts :

— Explorer la biodiversité et sélectionner

La capsule à membrane conductrice ouvre la voie vers la sélection de micro-organismes suivant leur électroactivité. À partir d'une population bactérienne initiale, elle permet la culture parallélisée de sous populations issues de l'échantillon de départ. L'électroactivité des bactéries peut ensuite être sondée par connexion électrique de la membrane conductrice des capsules. La parallélisation du dispositif de mesure pourrait permettre la sélection de la population la plus efficace. On peut expliciter ici deux pistes pouvant permettre d'isoler de nouveaux micro-organismes électroactifs performants. La première consiste en l'encapsulation à faible concentration de bactéries électroactives connues comme *G. sulfurreducens*. En diminuant l'inoculum, l'apparition de diversité au sein d'une espèce est favorisée. Cette diminution de concentration pourrait être poussée jusqu'à la création de capsules hébergeant des colonies monoclonales. En s'inspirant de

l'étude de Yi et al. [143], on pourrait également penser à imposer un stress à la population étudiée afin de favoriser l'apparition de variants de l'espèce plus performants. Une autre approche serait d'isoler les espèces électroactives les plus performantes présentes au sein de biofilms naturels de piles à bactéries. La culture compartimentée monoclonale permet à chaque organisme de se développer sans stress physique lié à la coculture comme le manque d'espace notamment. Cette approche permettrait par exemple d'isoler des micro-organismes hautement électroactifs mais au temps de division long donc peu représentés dans les biofilms naturels.

— Un outil pour l'étude des interactions entre espèces

Dans les piles microbiennes, une communauté bactérienne électroactive effectue des réactions en chaînes pour convertir des molécules complexes en électrons. Les bactéries sont donc en "collaboration". La compréhension des interactions entre les espèces permettrait d'optimiser la conversion de molécules complexes en substrat et en courant électrique.

L'encapsulation permet de séparer physiquement les micro-organismes en conservant la communication chimique entre les capsules. En utilisant les capsules à cœur liquide, il est donc possible d'étudier simplement les collaborations entre espèces sans avoir à les mélanger en solution. On peut par exemple penser à utiliser une capsule à membrane conductrice dans l'étude des collaborations consacrées à la conversion de substrat en électricité. Encapsulées séparément, les espèces peuvent s'échanger des produits de dégradations. La capsule "anode" connectée électriquement contenant des bactéries électroactives représenterait alors le dernier maillon de la chaîne et permettrait une mesure électrique caractérisant les performances de la collaboration.

— Production d'électricité en flux continu

Enfin, la culture compartimentée pourrait être mise au profit d'une production d'électricité efficace et facilitée. Comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif, la perfusion de la chambre anodique de MFC par un flux continu de substrat permet l'obtention de meilleurs performances. Dans notre cas, la méthode de fabrication autorise la création d'un grand nombre de réservoirs en parallèle. Avec ces capsules, il est possible de créer un empilement compact traversé par un flux de milieu. Intégré dans un système de connexion adapté, cette empilement permettrait d'extraire le courant généré par chaque capsule et donc l'obtention de courants importants.

Parmi ces différents axes, l'encapsulation pour explorer la biodiversité représente notre projet futur principal. Le criblage de micro-organismes nécessite un échantillonnage à haut débit. La technique de fabrication que nous utilisons pourrait alors représenter une limite pour la création d'un grand nombre réservoirs dans un temps raisonnable. En effet, en régime goutte à goutte, l'augmentation des débits est limitée par la transition vers la formation d'un jet. En 2014, les travaux de Hugo Doméjean [30] ont montré qu'il était possible de créer des capsules à cœur liquide et à membrane d'hydrogel de taille contrôlée à haut débit à partir de ce jet. Cette technique permet la création de capsules de 400 μm de diamètre à une fréquence de l'ordre du kHz. Dans le futur, la création de capsules à membrane conductrice par formation

Conclusion Générale

d'un jet représente une amélioration technique envisageable.

Annexe A

Calcul du coefficient de partage H_2O /Alginate et du coefficient de diffusion du Ferrocène méthanol dans l'alginate

L'étude suivante présente la détermination du coefficient de partage du ferrocène méthanol (FcMeOH) entre une phase aqueuse et une phase hydrogel. Menée par électrochimie, elle permet également d'estimer la valeur du coefficient de diffusion du FcMEOH dans l'hydrogel d'alginate à 2 %.

Dans le fond d'un pilulier, on place 1 mL d'une solution d'alginate de sodium à 2%. On ajoute ensuite 0,5 mL de $BaCl_2$ à 5% sans mélanger et 1 mL d'une solution de FcMeOH (FcMeOH 1 mmol.L⁻¹; KCl 0,1 mol.L⁻¹). L'alginate gélifie alors dans le fond du pilulier par l'action du baryum. L'ensemble est laissé à équilibrer sans agitation pendant 24 heures. En gélifiant, l'hydrogel se contracte. Le volume de solution d'alginate initialement introduit n'est donc pas égale au volume d'hydrogel obtenu. Le gel est donc pesé. La masse sèche est également mesurée afin d'évaluer la densité de l'hydrogel ($\sim 1,03$). Sa masse et sa densité permettent de remonter au volume de l'hydrogel, ici $V_{Alg} = 1,23 \text{ cm}^3$. Par conservation du volume : $V_{sol} = V_0 - V_{Alg} = 1,27 \text{ cm}^3$

En résumé :

$$V_0 = 2,5 \text{ cm}^3,$$

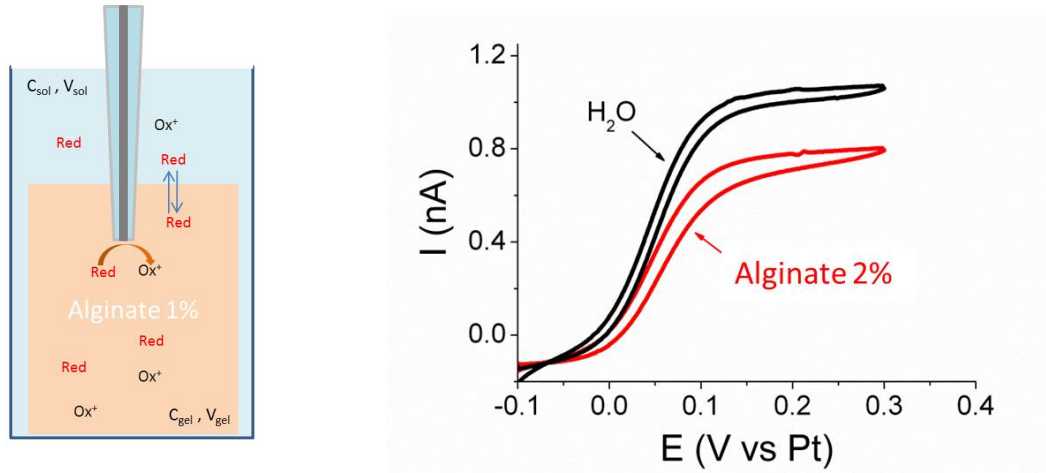
$$C_0 = 0,4 \text{ mmol.L}^{-1},$$

$$V_{sol} = 1,27 \text{ cm}^3,$$

$$V_{Alg} = 1,23 \text{ cm}^3.$$

L'échantillon est analysé à l'aide d'une micro-électrode (UME) de diamètre 12,5 μm . Des voltampérométries cycliques sont effectuées en solution et à l'intérieur du gel. Les configurations des mesures sont décrites schématiquement sur la figure A.1(a).

Annexe A. Calcul du coefficient de partage H₂O/Alginate et du coefficient de diffusion du Ferrocène méthanol dans l'alginate



(a) Schéma de l'échantillon bi-phasique eau/gel analysé par voltampérométrie cyclique à l'aide d'une UME. (b) CV enregistrées dans le gel d'alginate à 2 % et en solution en présence de 1 mmol.L⁻¹ de FcMeOH. Vitesse de balayage : 50 mV.s⁻¹

FIGURE A.1 – Voltampérométrie cyclique dans l'hydrogel d'alginate

Dans le cadre d'une voltampérométrie cyclique, une UME permet l'obtention d'un régime stationnaire en un temps très court : $t \simeq r^2/D \simeq 0,16$ s avec $D = 10^{-5}$ cm²/s et $r = 12,5$ μm. Si un potentiel adapté à la réduction ou à l'oxydation immédiate d'une espèce en solution est appliqué à l'UME, le courant stationnaire vaut :

$$i_{\text{stat}} = 4nrFDC$$

avec n le nombre d'électrons impliqués, r le rayon de l'UME (12,5 μm, F la constante de Faraday, D le coefficient de diffusion de l'espèce redox, et C sa concentration en solution.

Les courbes de voltampérométries cycliques réalisées dans l'eau et l'alginate sont exposées sur la figure A.1(b). Les courants stationnaires (I_{stat}) sont différents suivant le milieu testé lors de la CV. Cette différence témoigne d'une variation du coefficient de diffusion du FcMeOH et de sa concentration suivant la phase considérée.

Dans l'eau, le coefficient de diffusion du FcMeOH vaut, $D_{\text{H}_2\text{O}} = 7,8 \cdot 10^{-6}$ cm²/s et la CV donne $I_{\text{H}_2\text{O}} = 1.10^{-9}$ A, or :

$$I_{\text{H}_2\text{O}} = 4nrFD_{\text{H}_2\text{O}}C_{\text{sol}}$$

donc : $C_{\text{sol}} = 0,3$ mmol.L⁻¹

Par conservation de la matière :

$$C_0V_0 = C_{\text{sol}}V_{\text{sol}} + C_{\text{Alg}}V_{\text{Alg}}$$

donc : $C_{\text{Alg}} = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$

Dans le gel d'alginate, la CV donne $I_{\text{H}_2\text{O}} = 0,67.10^{-9} \text{ A}$:

$$I_{\text{Alg}} = 4nrFD_{\text{Alg}}C_{\text{Alg}}$$

donc : $D_{\text{Alg}} = 2,8.10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$.

En conclusion, les voltampérométries cycliques ont permis l'obtention des valeurs suivantes :

— Le coefficient de diffusion du FcMeOH dans l'alginate à 2% :

$$D_{\text{Alg}} = 2,8.10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$$

— Le coefficient de partage du FcMeOH entre l'eau et l'hydrogel d'alginate :

$$P_{\text{Alg}/\text{H}_2\text{O}} = \frac{C_{\text{gel}}^{eq}}{C_{\text{H}_2\text{O}}^{eq}} = 1,6$$

Annexe B

**Article : Multiscale electrochemistry
of hydrogels embedding conductive
nanotubes**



Cite this: *Chem. Sci.*, 2015, 6, 3900

Multiscale electrochemistry of hydrogels embedding conductive nanotubes†

Jean-Marc Noël,^{‡a} Léopold Mottet,^{‡b} Nicolas Bremond,^b Philippe Poulin,^c Catherine Combellas,^a Jérôme Bibette^b and Frédéric Kanoufi^{*a}

The local functionalities of biocompatible objects can be characterized under conditions similar to the operating ones, using scanning electrochemical microscopy (SECM). In the case of alginate beads entrapping carbon nanotubes (CNTs), SECM allows evidencing of the local conductivity, organization, and communication between the CNTs. It shows that the CNT network is active enough to allow long range charge evacuation, enabling the use of alginate/CNT beads as soft 3D electrodes. Direct connection or local interrogation by a microelectrode allows visualization of their communication as a network and eventually the study of them individually at the nanoscale.

Received 12th February 2015
Accepted 2nd April 2015

DOI: 10.1039/c5sc00549c

www.rsc.org/chemicalscience

Introduction

Hydrogels are soft materials mainly composed of water embedded in a polymeric matrix. Their wide range of applications, from the food industry and drug delivery¹ to tissue engineering,² and their rich physicochemical features make them appealing from both fundamental and applied viewpoints. Most hydrogels are biocompatible by nature and are thus well suited for biotechnology uses. As for other polymer based materials, mixing two kinds of macromolecule charges offers extra properties to the final composite such as stretchability³ or electrical conductivity.⁴

In a different way, conductive hybrid hydrogels can be obtained by dispersing mineral charges, such as carbon nanotubes.⁵ Moreover, incorporating conductive particles opens the way to advanced conducting materials for energy storage,^{6,7} biosensors⁸ or synthetic tissues.⁹ In the design of such smart functional materials, it is then important to assess the availability of their functionalities, particularly *in situ* while they are operated. Owing to the various shapes, softness and

composition (>90% of water) of hydrogels, SEM or AFM are much less well adapted for imaging their structure without physical disturbance than Scanning Electrochemical Microscopy, SECM, since for SEM, water has to be removed, whilst for AFM, there is contact between the tip and the surface. Conversely, SECM is an *in situ* local (electro) chemical probe technique that is well adapted to smart soft object imaging. SECM successfully allows the characterization of soft spherical objects, such as polymeric microbeads¹⁰ or vesicles.^{11–13} Regarding permeable materials, SECM is able (i) to reveal ion transport through a nanoporous membrane,¹⁴ with capability for preferential transport path imaging,¹⁵ or (ii) to quantify local conductive sites at an interface.^{16,17} Local electrochemical probe microscopy techniques, such as SECM or scanning electrochemical cell microscopy (SECCM), are ideal to characterize *in situ* the conductive properties of materials such as CNT based materials going from single CNTs^{17,18} to CNT networks.^{19–21} Only a few approaches have been reported to study the electrochemical activity of CNTs, or other graphene-like materials, mixed with polymers,^{22,23} even though CNTs offer promising strategies for the development of novel methodologies for the formulation of energy storage materials.

Herein, we have focused on auto-organized spherical soft objects engineered from carbon nanotubes (CNTs) and an alginate biopolymer, owing to a millifluidic dropping method. We have quantified and imaged *in situ* the active sites of such as-formed functional permeable objects using SECM. The ultramicroelectrode (UME) tip of the SECM will be especially used to (i) probe the actuable hydrogel beads under the operation conditions, (ii) quantify the increase in conductivity upon CNT incorporation, (iii) characterize the organization of the conductive network, and (iv) show how it can be used to directly address or connect the conductive network.

^aSorbonne Paris Cité, Paris Diderot University, Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), CNRS-UMR 7086, 15 rue J. A. de Baïf, 75013 Paris, France. E-mail: frederic.kanoufi@univ-paris-diderot.fr; Fax: +33 157277263; Tel: +33 157277217

^bLaboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés, Institute of Chemistry, Biology and Innovation (CBI) – ESPCI ParisTech/CNRS-UMR8231/PSL* Research University, 10 rue Vauquelin 75231, Paris Cedex, France

^cCentre de Recherche Paul Pascal – CNRS, University of Bordeaux, 115 Avenue Schweitzer, 33600 Pessac, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Alginate/carbon nanotube bead fabrication and optical image, SECM approach curves in benzonitrile, 2D conductivity images, SECM of the tip penetrating inside the bead and Digisim® simulation of cyclic voltammograms obtained at an UME inside a 1% CNT bead. See DOI: 10.1039/c5sc00549c

‡ The first two authors contributed equally to this work.



Results and discussion

SECM approach toward a conductive permeable hydrogel

As described in the ESI (Fig. S1†), multi-walled carbon nanotubes are sonicated with sodium dodecylsulfate then mixed with alginate. This solution is dropped into a calcium bath to create alginate/CNT beads. Such 3 mm diameter alginate beads, modified with different percentages of CNTs (0 to 1 wt%), were characterized using SECM in the feedback mode in a solution containing a redox mediator, namely ferrocene methanol (FcMeOH) (Fig. 1A). In this mode, an UME tip oxidizes the redox mediator while it is approaching the alginate bead. Far from the object, it produces a steady-state current (i_{inf}) that is limited by redox mediator diffusion. In the vicinity of the object and if the latter has conductive properties, the redox mediator is regenerated to its pristine state, yielding a feedback current at the UME tip. The evolution of the normalized tip current, $I = i/i_{inf}$, with the tip-object separation distance, d (also in a normalized form $L = d/a$ with a as the UME tip radius), gives the so-called approach curve. As alginate beads are biocompatible and mostly used in aqueous media, the analysis of their conductive properties is performed in water. Indeed, SECM approach curves for the beads were obtained in a KCl medium containing FcMeOH as the redox mediator.

The approach curve recorded for an alginate bead free of CNTs (Fig. 1B, thick light green curve, ○) is different from the one corresponding to classical insulating behavior.¹⁵ This difference is attributed to the partition of FcMeOH between the aqueous phase and the hydrogel, and its transport in both phases. Indeed, an approach curve recorded for a hydrogel bead from a water-immiscible solvent (benzonitrile, BZN), with a hydrophobic redox mediator (decamethylferrocene, DcFc, Fig. S2†), presents insulating behavior (negative feedback), which means that the redox mediator does not permeate the alginate bead and no charge transfer occurs at the alginate/BZN interface. Thus, as proposed in earlier work,^{24–28} the partition process can be quantitatively described through finite element methods modeling (Comsol) of the approach curve. In the

absence of CNTs, the experimental curve fits well to a theoretical insulating porous behavior (Fig. 1B, black line).

When CNTs are added inside the hydrogel beads (from 0.13 to 1 wt%), the approach curves show higher feedback currents than in the former insulating case, as the redox mediator is regenerated at the alginate/CNT bead surface (Fig. 1B). A feedback current is detected at the tip for a CNT concentration as low as 0.13 wt%, and this feedback increases with the CNT concentration.

A quantitative estimate of the feedback and therefore of the apparent interfacial charge transfer for each bead composition is provided by modelling the data for the permeation of the redox species in the alginate bead phase and the interfacial electron transfer process (regeneration of FcMeOH) at the water/bead interface. The permeation takes into account the higher reservoir of the redox mediator provided by the bead. The apparent interfacial ET reasonably averages the contribution from regeneration within the volume of the bead. As a first approach, we believe that this model is sufficient. Indeed, owing to the size of the UME (25 μm diameter) and the diffusion coefficient of the redox mediator within the hydrogel, which is about 3 times lower than in aqueous media, the redox mediator will be regenerated from within 10 μm deep inside the hydrogel and could be considered as a weak contribution to the homogeneous phase. This simple theoretical framework yields a reasonable fit of the experimental approach curves, as shown in Fig. 1B. It is noteworthy that some deviation between the experimental and the fitted approach curve can be observed, in Fig. 1B, for the bead containing 0.3% CNTs. This could suggest that the regeneration of the redox mediator outside the area of the UME is limited. This imbalance could be created in the case of inhomogeneous repartition or accessibility of the CNTs at the surface (as attested later by the SECM image provided in Fig. 2A) or inside the bead. This could be paralleled to systems for which the probed conductor is not much larger than the tip.²⁹ However, this interpretation is at this point speculative and probably true only for a low percentage of CNTs since at 1% CNTs the accessibility of the CNTs is homogeneous (as also confirmed by the SECM image discussed later, Fig. 2B).

Even if a more refined model considering homogeneous charge transfer within the bead phase and requiring at least 2 other adjustable parameters would be more complete, the fit provided by the simplest model is reasonable, as was also suggested in other related systems combining layers of polymers embedding CNTs. Moreover, in the literature, the irreversible charge transfer model appeared to be a well adapted approach to study nanoparticles or carbon nanotubes trapped at various interfaces.^{19,30–35} More notably, the apparent charge transfer rate constant determined from the approach curve fitting increases linearly with the percentage of CNTs trapped inside the hydrogel. Moreover, the increase of FcMeOH concentration does not increase the charge transfer rate (not shown). These observations on the charge transfer process at the bead surface upon CNT incorporation suggest that conductive sites, likely CNTs arranged in a nanoelectrode network, are now exposed and available at the bead surface to the solution phase. As the bead is not connected to any electrical source, the observation of a

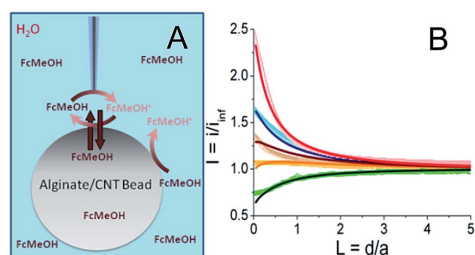


Fig. 1 (A) Principle of the SECM approach curves for a 2 mm diameter alginate/CNT bead in a 0.1 M KCl + 1 mM CaCl_2 aqueous solution containing 1 mM FcMeOH. (B) Approach curves recorded with a 12.5 μm Pt UME tip toward alginate beads containing CNTs: 0 (○), 0.13 (○), 0.3 (□), 0.55 (□), and 1 (□) wt%. Lines are the simulated curves for irreversible electron transfer kinetics. $k_{\text{et}} = 0, 1.82, 3.65, 6.08$ and $12.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ for, respectively, 0, 0.13, 0.3, 0.55 and 1 wt%, using $D = 7.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for the diffusion coefficient of FcMeOH in water.



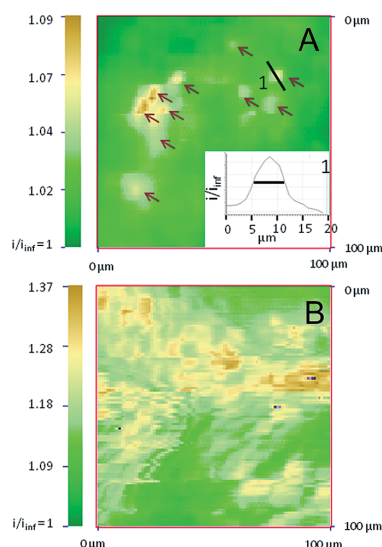


Fig. 2 SECM images of alginate/CNT beads containing (A) 0.3 and (B) 1 wt% CNTs recorded in a 0.1 M KCl + 1 mM CaCl₂ aqueous solution containing 1 mM FcMeOH. Using a 400–500 nm radius Pt nanotip at a 10 $\mu\text{m s}^{-1}$ velocity. The nanotip was kept less than 1 μm from the surface. The current scale was normalized using the steady state current recorded in the bulk solution. In (A), the arrows point to the 10 most conductive spots and the inset shows the current profile along the black line of one spot.

steady-state charge transfer at the bead surface also indicates that upon redox mediator regeneration (reduction of FcMeOH⁺ by the CNTs), charges (electrons and ions) are readily propagated within the bead to be evacuated toward the solution or deeper into the bead (by the oxidation of FcMeOH, see Fig. 1A) at distances larger than the UME tip size.

2D SECM conductivity images

SECM also allows imaging of the distribution of the reactive sites responsible for the surface conductivity of the outer membrane of the alginate/CNT beads. Using the same 12.5 μm radius UME tip, an image from the apex of a bead containing 0.55 wt% CNTs (Fig. S3A[†]), recorded in a FcMeOH aqueous medium, presents a homogeneous conductivity (in line with the reproducibility of the approach curves performed at different locations). With a nanoelectrode (nanotip, 400–500 nm radius),^{36,37} a higher resolution is expected for the electrochemical image of the bead. Few individual small conductive spots with 5–10 μm FWHM diameter ($\sim 6 \mu\text{m}$, in inset) are revealed for beads containing 0.3 wt% of CNTs, as shown in Fig. 2A, whereas the density of these active regions significantly increases when the CNT wt% entrapped inside the gel increases to 0.55 (Fig. S3B[†]) and 1 wt% (Fig. 2B).

At low concentrations of CNTs, the SECM images show that only a few agglomerates are exposed directly to the external solution and work as a network of individual microelectrodes. Assuming each spot acts as an individual microelectrode, their

size can be estimated from the maximum feedback they sustain (measured from Fig. 2A),³⁸ and can be compared to the theoretical values obtained from finite element methods modeling (Comsol). Typically, the ten intense spots resolved in Fig. 2A with i/i_{inf} values in the 1.03–1.09 range (see arrows) correspond to feedback responses of individual microelectrodes separated by 1 μm from a 1 μm diameter nanotip with an apparent diameter in the 1–1.5 μm range. This is in reasonable agreement with Fig. 2A since, due to convolution with the tip size, the SECM image of these individual microelectrodes would ideally be of 2–3 μm diameter active spots.

It is noteworthy that the density of these active sites (40–50 μm^2 over a 10⁴ μm^2 image) is within the 0.3% density of the CNTs incorporated in the bead. The spacing between each of these active spots is higher than the nanotip dimension used for their imaging in Fig. 2A. This strongly suggests that if these spots are detected electrochemically with both 1 and 12.5 μm radius tips, they are connected to each other for charge evacuation.

The contrast and density of the apparent active sites revealed in the SECM images also reflect the overlapping of the diffusion layers generated by the network of microelectrodes formed by the CNT assemblies. It allows imaging of the individual location of the spots and also their range of cross-talk. For a low concentration of CNTs, overlapping of the diffusion layers of the microelectrode network is evidenced and limited to the upper part of Fig. 2A. The increase of the CNT concentration results in an apparent increase of the number of conductive spots and significant overlapping of the diffusion cross-talk, as shown in Fig. S3B[†] and 2B for 0.55 and 1 wt% CNT beads respectively. The feedback ($1.09 < i/i_{\text{inf}} < 1.37$) recorded over the whole imaged surface is significant and compares to the maximum expected current for a positive feedback for tip-to-bead separation distance $d = 1$ or $0.5 \mu\text{m}$ ($i/i_{\text{inf}} = 1.25$ or 1.57 , respectively). The full regeneration of the redox mediator at the bead is then detected by the SECM nanotip over regions expanding over several tens of μm^2 , showing the large interpenetration of the active spots' fields of action. This then suggests that the bead with 1 wt% CNTs is comparable to an array of nanoelectrodes, which behave as a "macroelectrode", owing to the overlapping of the individual diffusion layers.^{31,39} These features, which are shown in Fig. 2B, could then reveal the topography of the macroelectrode and therefore the topography of the bead surface, where the regions of higher current are overhanging by as much as 1 μm in the lower current regions. The differences between Fig. 2A and B further suggest that the CNT assembly is homogeneously distributed at high CNT concentrations and more segregated at lower concentrations. Finally, both SECM images and approach curves show that the CNTs entrapped in an alginate bead behave as macro- or micro-electrode arrays. Definitely, such an observation requires that charge evacuation occurs efficiently within the bead, certainly through a percolated CNT network entrapped within the hydrogel. If micro- or nano-electrochemical probes allow evidencing and imaging of the structure of the CNT percolation in the hydrogel beads, the macroscopic range of the charge transfer (or percolation) within the bead can be explored by direct electrical connection of the bead.



Connection to a conductive network

Penetrating the UME tip inside the bead allows inspection of the extent of the conductive network within the alginate bead. The approach curve from the solution to the bead interior is depicted in Fig. S4† where the solution/bead interface is indicated as a red vertical line; the deeper the penetration into the bead, the higher the feedback current. At $\sim 50 \mu\text{m}$ penetration inside the bead, the tip current increases by several orders of magnitude (from 2 nA in the solution to several μA), suggesting that the UME tip has electrically connected the CNT percolated network. It is then no longer possible to interrogate the micro-environment of the tip, only the entire range of the percolated network functioning as a macroelectrode.

One benefit of using a UME for this connection is the large increase of current from the transition between microelectrode and macroelectrode behaviour. Another is the ability to reversibly connect the percolated network without too much physical perturbation of the object (Experimental details in ESI†).

It is interesting to note here that no significant increase in the current was detected during the connection to 0.13, 0.3 and 0.5 wt% CNT beads, traducing the efficient percolation detected between 0.5 and 1 wt%.

The principle behind the connection between the UME tip and the CNT network in a 1 wt% CNT bead is illustrated in Fig. 3A together with the resulting cyclic voltammogram (CV) of the FcMeOH oxidation (Fig. 3B). It would be interesting to compare the charge transfer capacities of the beads obtained using the probe approach curves, Fig. 1, at different concentrations of CNTs with CVs recorded at different CNT content; unfortunately it was not possible to properly connect the conducting network with the UME for a concentration below 1%,

probably because of the limited accessibility of the CNT network at a low percentage of CNTs and a higher resistance of the bead. This particularly highlights the unique potentiality of SECM to address the electrochemical activity of such soft objects with low conductivity.

The CV of a bead containing 1 wt% CNT (Fig. 3B) shows the classical response expected for a macroelectrode, except that the peak to peak separation potential, $\Delta E_p = 536 \text{ mV}$ at $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, is much higher than the theoretical value obtained at a classical metallic electrode for a diffusion process ($\Delta E_p = 60 \text{ mV}$). This behavior illustrates a large charge transfer resistance probably due to a limited accessibility of the deeper regions of the CNT network. However, this experiment clearly shows the possibility to connect the CNT network trapped inside the hydrogel. The peak current (I_p) also varies linearly with $v^{1/2}$ (inset in Fig. 3B). Even if the electrochemical response shows considerable ohmic contribution, the $I_p - v^{1/2}$ response may suggest a diffusion-controlled limitation. From this experiment and using a FcMeOH diffusion coefficient in alginate of $D_{\text{FcMeOH/Alg}} = 2.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, both the equivalent resistance and surface area of the connected 1 wt% CNT network can be estimated from simulation of the CVs (see ESI†). The UME-bead electrical contact is equivalent to a 3.3 mm^2 electrode of $80 \text{ k}\Omega$ resistance. This means that by coming into contact with the bead, the active area of the UME tip used as a connector is multiplied by 6.7×10^3 . Such a significant increase shows a volumetric percolation of the CNT network through the bead. Of course, since the cyclic voltammetry was conducted in an aqueous medium and due to the high permeability of the bead, the CV may result from the response of a volume fraction of the bead.

A further picture of the electrochemical characteristics for the alginate/CNT bead was obtained by separating the outer surface and the bulk bead contributions. For this purpose, a bead was equilibrated in a hydroquinone (HQ) solution and then immersed into a BZN electrolyte containing DcFc as a redox mediator (Fig. 3C). The CV obtained by the same electrical connection to an UME tip (Fig. 3D) shows two reversible waves corresponding to the response of both the redox mediator (DcFc in the BZN phase) and HQ (inside the hydrogel). This clearly shows that it is possible to connect the outer surface of the bead with its interior (the electrode was inserted $<100 \mu\text{m}$ inside the bead), showing a long distance percolation range of the CNT network. A more quantitative estimate of the equivalent electroactive surface area is obtained for the outer surface (from the DcFc CV) and the volumetric network (from the HQ CV) of the bead from the respective peak current analysis. This ensures that 0.3 mm^2 of the external surface of the bead is active (using $D_{\text{DcFc/BZN}} = 4.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for DcFc diffusion in BZN), which corresponds to 1% of the surface of the bead. Due to the large overlapping of the active nanodomains formed by the CNT network evidenced by SECM, this value suggests that the electrical connection is effective for electrochemical measurements over the 1% area in the vicinity of the electrical connection. Typically, the UME tip addresses here an electrically connected region equivalent to a 0.3 mm radius disk electrode. Conversely, the part of the CNT network connected within the interior of the bead has an active area of 0.8 mm^2 (considering $D_{\text{HQ/Alg}} =$

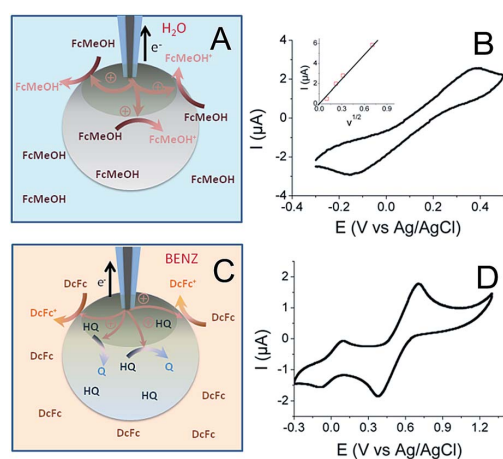


Fig. 3 (A and C) Principle of the direct connection of an alginate bead with a $12.5 \mu\text{m}$ radius UME tip. (B and D) Cyclic voltammograms recorded at a scan rate of $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ for a 3 mm diameter alginate bead containing 1 wt% CNTs: (B) in a $0.1 \text{ M KCl} + 1 \text{ mM FcMeOH}$ aqueous solution (inset: peak current, I_p , as a function of $v^{1/2}$); (D) equilibrated with an aqueous solution of 1 mM hydroquinone (HQ) and immersed into a $1 \text{ mM DcFc} + 0.1 \text{ M NBu}_4\text{BF}_4$ BZN solution.



$D_{\text{FeMeOH/Alg}} = 2.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). The electrically connected alginate/CNT bead then behaves as a macroscopic porous electrode. From the area connected at the outer surface, it is anticipated that the electrical connection inside the bead expands only over a hemisphere of similar radius (0.3 mm). Such a percolated porous electrode then behaves as a 0.3 mm hemisphere electrode, leading to a 2-fold increase of the inside electroactive area, in reasonable agreement with the 2.6-fold increase observed.

Conclusions

These preliminary investigations show the ability of SECM to characterize the availability of physical or chemical functionalities of smart, soft, biocompatible objects, under conditions similar to their operating ones, without physical perturbation, which is very important for maintaining the structure of the composite. Thus, approach curves obtained with an UME tip at the surface of a hydrogel bead entrapping CNTs allow easy characterization of their local conductivity. High resolution SECM imaging clearly evidences the local availability, organization, and communication of the functional objects entrapped within the composite (here CNT modified hydrogel beads). At low content, the CNTs assemble in individual segregated bundles of approx. 5 μm in diameter. The bead is then not conductive enough to be addressed electrochemically by cyclic voltammetry, which highlights the unique proficiency of SECM for the electrochemical characterization of such poorly conductive soft objects. At higher concentrations, the CNT distribution is more homogeneous and the bead is a dense overlapping network of nanoelectrodes, which behaves as a rough macroelectrode. In all cases, the CNT network is active enough to allow long range charge evacuation, enabling the use of alginate/CNT beads as soft 3D electrodes. This is confirmed from the direct connection of the CNT network to the UME tip. It is then possible to address, with a 12.5 μm radius UME inserted inside the bead, the whole electrical volume or surface in a liquid/liquid environment within a range of 300 μm from the tip-bead contact. The use of this 3D biocompatible hydrogel can be extended to the trapping and further electrochemical addressing of many other kinds of objects, such as nanoparticles, electroactive molecules or biological entities. The direct connection or local interrogation by microelectrodes allows visualization of their communication as a network and eventually the study of them individually at the nanoscale. The potentiality of such hydrogels in a liquid/liquid environment was also demonstrated, which is appealing in the development of soft materials for energy storage/release.

Acknowledgements

This work was supported by Université Paris-Diderot, ESPCI and CNRS.

Notes and references

1 T. R. Hoare and D. S. Kohane, *Polymer*, 2008, **49**, 1993.

- 2 K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 1869.
- 3 J.-Y. Sun, X. Zhao, W. R. K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K. H. Oh, D. J. Mooney and Z. Suo, *Nature*, 2012, **489**, 133.
- 4 A. Guiseppi-Elie, *Biomaterials*, 2010, **31**, 2701.
- 5 Z. Yang, Z. Cao, H. Sun and Y. Li, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 2201.
- 6 H. Wu, G. Yu, L. Pan, N. Liu, M. T. McDowell, Z. Bao and Y. Cui, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 1943.
- 7 B. Liu, P. Soares, C. Checkles, Y. Zhao and G. Yu, *Nano Lett.*, 2013, **13**, 3414.
- 8 D. Zhai, B. Liu, Y. Shi, L. Pan, Y. Wang, W. Li, R. Zhang and G. Yu, *ACS Nano*, 2013, **7**, 3540.
- 9 R. A. MacDonald, C. M. Voge, M. Kariolis and J. P. Stegemann, *Acta Biomater.*, 2008, **4**, 1583.
- 10 C. N. Kirchner, M. Träuble and G. Wittstock, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2626.
- 11 W. Zhan and A. J. Bard, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 726.
- 12 D. Correia-Ledo, A. A. Arnold and J. Mauzeroll, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15120.
- 13 R. Tomasi, J.-M. Noël, A. Zenati, S. Ristori, F. Rossi, V. Cabuil, F. Kanoufi and A. Abou-Hassan, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 1854.
- 14 M. Shen, R. Ishimatsu, J. Kim and S. Amemiya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 9856.
- 15 *Scanning Electrochemical Microscopy*, ed. A. J. Bard and M. V. Mirkin, Taylor & Francis, New York, 2012.
- 16 J. Azevedo, C. Bourdillon, V. Derycke, S. Campidelli, C. Lefrou and R. Cornut, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1812.
- 17 J. Kim, H. Xiong, M. Hofmann, J. Kong and S. Amemiya, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 1605.
- 18 A. G. Güell, K. E. Meadows, P. V. Dudin, N. Ebejer, J. V. Macpherson and P. R. Unwin, *Nano Lett.*, 2014, **14**, 220.
- 19 N. R. Wilson, M. Guille, I. Dumitrescu, V. R. Fernandez, N. C. Rudd, C. G. Williams, P. R. Unwin and J. V. Macpherson, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7006.
- 20 T. S. Miller, N. Ebejer, A. G. Güell, J. V. Macpherson and P. R. Unwin, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 7435.
- 21 A. G. Güell, N. Ebejer, M. E. Snowden, K. McKelvey, J. V. Macpherson and P. R. Unwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 11487.
- 22 V. A. Pedrosa, T. Gnanaprakasa, S. Balasubramanian, E. V. Olsenc, V. A. Davis and A. L. Simonian, *Electrochem. Commun.*, 2009, **11**, 1401.
- 23 M. E. Snowden, M. A. Edwards, N. C. Rudd, J. V. Macpherson and P. R. Unwin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 5030.
- 24 A. L. Barker and P. R. Unwin, *J. Phys. Chem.*, 2001, **105**, 12019.
- 25 P. Bertinello, I. Ciani, D. Marenduzzo and P. R. Unwin, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 294.
- 26 C. Cannes, F. Kanoufi and A. J. Bard, *Langmuir*, 2002, **18**, 8134.
- 27 J. Guo and S. Amemiya, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 2147.
- 28 J. Kim, A. Izadyar, N. Nioradze and S. Amemiya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 2321.
- 29 A. I. Oleinick, D. Battistel, S. Daniele, I. Svir and C. Amatore, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 4887.
- 30 J. Zhang, R. M. Lahtinen, K. Kontturi, P. R. Unwin and D. J. Schiffrin, *Chem. Commun.*, 2001, 1818.





Edge Article

View Article Online
Chemical Science

- 31 B. M. Quinn, I. Prieto, S. K. Haram and A. J. Bard, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 7474.
- 32 P. Liljeroth, D. Vanmaekelbergh, V. Ruiz, H. Jiang, E. Kauppinen and B. M. Quinn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7126.
- 33 P. G. Nicholson, V. Ruiz, J. V. Macpherson and P. R. Unwin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 5096.
- 34 F. Li, I. Ciani, P. Bertocello, P. R. Unwin, J. Zhao, C. R. Bradbury and D. J. Fermin, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 9686.
- 35 J.-M. Noël, D. Zigah, J. Simonet and P. Hapiot, *Langmuir*, 2010, **26**, 7638.
- 36 B. Ballesteros Katemann and W. Schuhmann, *Electroanalysis*, 2002, **14**, 22.
- 37 J. Velmurugan, P. Sun and M. V. Mirkin, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 459.
- 38 C. Amatore, J.-M. Savéant and D. Tessier, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1983, **147**, 39.
- 39 N. Godino, X. Borrisé, F. X. Muñoz, F. J. del Campo and R. G. Compton, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 11119.

Annexe C

Milieu de culture 826

Durant ces travaux de thèse, la culture de *G. sulfurreducens* a été effectuée dans un milieu spécifique. Nous décrivons dans cette annexe la composition et le protocole de fabrication du milieu 826. Ce milieu est ensuite modifié suivant la nécessité ou non de la présence d'un accepteur soluble d'électron.

Composition du milieu 826 (1 L) :

NH ₄ Cl	1,50 g
Na ₂ HPO ₄	0,60 g
KCl	0,10 g
Acétate de sodium	0,82 g
Eau distillée	930 mL
NaHCO ₃	2,50 g
Minéraux (<i>Trace mineral Supplement ATCC MD-TMS</i>)	10 mL
Vitamines (<i>Vitamin Supplement ATCC MD-VS</i>)	10 mL
Fumarate de sodium (solution à 16 % en masse)	50 mL

Protocole de fabrication :

Dissoudre dans l'eau distillée le NH₄Cl, le Na₂HPO₄, le KCl et l'acétate de sodium. Porter l'ensemble à ébullition pendant 5 minutes. Refroidir la solution à température ambiante sous bullage de N₂ + 20 %CO₂. Ajouter le bicarbonate de sodium. Par bullage de N₂ + 20 %CO₂, équilibrer le milieu à pH 6,8. Autoclaver le milieu. Ajouter ensuite les minéraux et les vitamines à température ambiante. Vérifier le pH, il doit être de 8,6.

Si l'expérience nécessite un accepteur d'électron soluble, ajouter le fumarate de sodium. On obtient ainsi le milieu 826.

Sinon, ajouter 10 mmol.L⁻¹ d'acétate de sodium à la place du fumarate de sodium. L'acétate peut être ajouté à partir d'une solution mère à 200 mmol.L⁻¹. On obtient ainsi le milieu 826(-).

Dans le cas d'une culture de *G. sulfurreducens* en caspule, ajouter un 0,1 mmol.L⁻¹ de BaCl₂ sous bullage de N₂ + 20 %CO₂ avant l'ajout des capsules dans le milieu.

Bibliographie

- [1] Akasaka, T. and Watari, F. (2009). Capture of bacteria by flexible carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia*, 5(2) :607–612.
- [2] Alessandri, K., Sarangi, B. R., Gurchenkov, V. V., Sinha, B., Kießling, T. R., Fetler, L., Rico, F., Scheuring, S., Lamaze, C., Simon, A., Geraldo, S., Vignjevic, D., Doméjean, H., Rolland, L., Funfak, A., Bibette, J., Bremond, N., and Nassoy, P. (2013). Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37) :14843–8.
- [3] Anseth, K. S., Bowman, C. N., and Brannon-Peppas, L. (1996). Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17(17) :1647–1657.
- [4] Armstrong, J. K., Wenby, R. B., Meiselman, H. J., and Fisher, T. C. (2004). The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophysical journal*, 87(6) :4259–4270.
- [5] Azevedo, J., Bourdillon, C., Derycke, V., Campidelli, S., Lefrou, C., and Cornut, R. (2013). Contactless surface conductivity mapping of graphene oxide thin films deposited on glass with scanning electrochemical microscopy. *Analytical chemistry*, 85(3) :1812–1818.
- [6] Badaire, S., Poulin, P., Maugey, M., and Zakri, C. (2004). In situ measurements of nanotube dimensions in suspensions by depolarized dynamic light scattering. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 20(24) :10367–70.
- [7] Baraban, L., Bertholle, F., Salverda, M. L. M., Bremond, N., Panizza, P., Baudry, J., de Visser, J. A. G. M., and Bibette, J. (2011). Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a chip*, 11(23) :4057–62.
- [8] Bard, A. and Faulkner, L. (1980). *Electrochemical methods*. John Wiley & Sons, Inc.
- [9] Bard, A. G. and Mirkin, M. V. (2012). *Scanning Electrochemical Microscopy*. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- [10] Barsoukov, E. J. and R., M. (2005). *Impedance Spectroscopy : Theory, Experiment, and Applications*. Wiley & Sons.

Bibliographie

- [11] Bauhofer, W. and Kovacs, J. Z. (2009). A review and analysis of electrical percolation in carbon nanotube polymer composites. *Composites Science and Technology*, 69(10) :1486–1498.
- [12] Bedioui, F., Griveau, S., and Pailleret, A. (2015). Microscopie électrochimique. *Techniques de l'ingénieur*.
- [13] Bird, R., Armstrong, R. C., and Hassager, O. (1987). *Dynamics of polymeric liquids, Volume 1, Fluid Mechanics*. Wiley & Sons.
- [14] Boitard, L., Cottinet, D., Kleinschmitt, C., Bremond, N., Baudry, J., Yvert, G., and Bibette, J. (2012). Monitoring single-cell bioenergetics via the coarsening of emulsion droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19) :7181–7186.
- [15] Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., and Lovley, D. R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. 295(January) :483–486.
- [16] Bond, D. R. and Lovley, D. R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3) :1548–1555.
- [17] Bouchoux, F. and Sablier, M. (2015). Voltampérométrie : Théorie et mise en œuvre expérimentale. *Techniques de l'ingénieur*.
- [18] Bremond, N., Santanach-Carreras, E., Chu, L.-Y., and Bibette, J. (2010). Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane : liquid pearls. *Soft Matter*, 6(11) :2484.
- [19] Cabane, B. and Henon, S. (2007). *Liquides, solutions, dispersions, émulsions, gels*. Belin.
- [20] Calabria, U., Coleman, B. J. N., Cadek, M., Blake, R., Nicolosi, V., Ryan, K. P., Belton, C., Fonseca, A., Nagy, J. B., Gun, Y. K., and Blau, W. J. (2004). High Performance Nanotube-Reinforced Plastics : Understanding the Mechanism of Strength Increase High-Performance Nanotube-Reinforced Plastics : Understanding the Mechanism of Strength Increase **. (August 2015).
- [21] Chang, C.-h. and Franses, E. I. (1995). Adsorption dynamics of surfactants at the air/water interface : a critical review of mathematical models, data, and mechanisms. 100.
- [22] Cheng, S., Liu, H., and Logan, B. E. (2006). Increased Power Generation in a Continuous Flow MFC with Advective Flow through the Porous Anode and Reduced Electrode Spacing. *Environmental Science & Technology*, 40(7) :2426–2432.
- [23] Cheng, Z., Zhu, J., Chaikin, P. M., Phan, S.-E., and Russel, W. B. (2002). Nature of the divergence in low shear viscosity of colloidal hard-sphere dispersions. *Physical Review E*, 65(4) :041405.
- [24] Choi, K., Ng, A. H., Fobel, R., and Wheeler, A. R. (2012). Digital Microfluidics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5(1) :413–440.

- [25] Correia-Ledo, D., Arnold, A. a., and Mauzeroll, J. (2010). Synthesis of redox active ferrocene-modified phospholipids by transphosphatidylation reaction and chronoamperometry study of the corresponding redox sensitive liposome. *Journal of the American Chemical Society*, 132(43) :15120–3.
- [26] Cottinet, D. (2013). *Diversité phénotypique et adaptation chez Escherichia coli étudiées en millifluidique digitale*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie.
- [27] Crank, J. (1975). *The Mathematics of diffusion*. Oxford University Press, Oxford.
- [28] Crittenden, S. R., Sund, C. J., and Sumner, J. J. (2006). Letter Mediating Electron Transfer from Bacteria to a Gold Electrode via a Self-Assembled Monolayer Mediating Electron Transfer from Bacteria to a Gold Electrode via a Self-Assembled Monolayer. *Society*, 17(22) :9473–9476.
- [29] Cruise, G. M., Scharp, D. S., and Hubbell, J. a. (1998). Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 19(14) :1287–1294.
- [30] Doméjean, H. (2014). *Formation de capsules d’hydrogel à cœur aqueux par fragmentation d’un jet composé de fluides complexes*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie.
- [31] Dufresne, A. (2002). Processing and characterization of carbon nanocomposites Processing and characterization of carbon nanotube / poly (styrene-co-butyl acrylate). (August 2015).
- [32] Dukhin, S., Kretzchmar, G., and Miller, B. (1997). *Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces*. Odile Jacobs, Science.
- [33] Dumas, C., Basseguy, R., and Bergel, A. (2008). Electrochemical activity of Geobacter sulfurreducens biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta*, 53(16) :5235–5241.
- [34] Ebbesen, T. W., Lezec H. J., Hiura H., Bennett J. W., Ghaemi H. F, T. T. (1996). Electric conductivity of individual carbon nanotubes.
- [35] Elworthy, P. and Mysels, K. (1966). The Surface Tension of SDS Solutions and the Phase Separation Model of Micelle Formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21 :331–347.
- [36] Evans, F. D. and Wennerström, H. (1999). *The colloidal domain*. Wiley-VCH.
- [37] Ferris, C. J. and in het Panhuis, M. (2009). Conducting bio-materials based on gellan gum hydrogels. *Soft Matter*, 5(18) :3430.
- [38] Flexer, V., Chen, J., Donose, B. C., Sherrell, P., Wallace, G. G., and Keller, J. (2013). The nanostructure of three-dimensional scaffolds enhances the current density of microbial bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 6(4) :1291.

- [39] Flint, S. H., Brooks, J. D., and Bremer, P. J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43(4) :235–242.
- [40] Franks, W., Schenker, I., Schmutz, P., and Hierlemann, A. (2005). Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52(7) :1295–1302.
- [41] Gabler, S., Stampfl, J., Koch, T., Seidler, S., Schuller, G., Redl, H., Juras, V., Trattinig, S., and Weidisch, R. (2009). Determination of the viscoelastic properties of hydrogels based on polyethylene glycol diacrylate (PEG-DA) and human articular cartilage. *International Journal of Materials Engineering Innovation*, 1(1) :3.
- [42] George, P. M., Lyckman, A. W., Lavan, D. a., Hegde, A., Leung, Y., Avasare, R., Testa, C., Alexander, P. M., Langer, R., and Sur, M. (2005). Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomaterials*, 26(17) :3511–3519.
- [43] Golikand, A. N., Didehban, K., and Rahimi, R. (2012). Investigation of the properties of conductive hydrogel composite containing zn particles. *Journal of Applied Polymer Science*, 126(2) :436–441.
- [44] Gracia, R. and Mecerreyes, D. (2013). Polymers with redox properties : materials for batteries, biosensors and more. *Polymer Chemistry*, 4(7) :2206.
- [45] Grossiord, N., Van Der Schoot, P., Meuldijk, J., and Koning, C. E. (2007). Determination of the surface coverage of exfoliated carbon nanotubes by surfactant molecules in aqueous solution. *Langmuir*, 23(7) :3646–3653.
- [46] Guiseppi-Elie, A. (2010). Electroconductive hydrogels : synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials*, 31(10) :2701–16.
- [47] Gutiérrez, M. C., Garcia-Carvajal, Z. Y., Hortigiela, M. J., Yuste, L., Rojo, F., Ferrer, M. L., and del Monte, F. (2007). Biocompatible MWCNT scaffolds for immobilization and proliferation of *E. coli*. *Journal of Materials Chemistry*, 17(29) :2992.
- [48] Guyon, E. and Hulin, J.-P. (1997). *Granites et Fumées : Un peu d'ordre dans le mélange*. Odile Jacobs, Science.
- [49] Hegreness, M., Shores, N., Hartl, D., and Kishony, R. (2006). An equivalence principle for the incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5767) :1615–1617.
- [50] Higgins, S. R., Foerster, D., Cheung, A., Lau, C., Bretschger, O., Minter, S. D., Neilson, K., Atanassov, P., and Cooney, M. J. (2011). Fabrication of macroporous chitosan scaffolds doped with carbon nanotubes and their characterization in microbial fuel cell operation. *Enzyme and microbial technology*, 48(6-7) :458–65.

-
- [51] Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.) :18–23.
- [52] Hou, H., Li, L., Cho, Y., de Figueiredo, P., and Han, A. (2009). Microfabricated microbial fuel cell arrays reveal electrochemically active microbes. *PloS one*, 4(8) :e6570.
- [53] Hrenovic, J. and Ivankovic, T. (2007). Toxicity of anionic and cationic surfactant to *Acinetobacter junii* in pure culture. *Central European Journal of Biology*, 2(3) :405–414.
- [54] Huang, L. and Logan, B. E. (2008). Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(4) :655–64.
- [55] Hunter, G. L. and Weeks, E. R. (2012). The physics of the colloidal glass transition. *Reports on Progress in Physics*, 75(6) :066501.
- [56] Iijima, S. et al. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*, 354(6348) :56–58.
- [57] Jestin, S., Maugey, M., Derre, A., Poulin, P., and Bordeaux, D. (2011). Scalable Process for the Spinning of PVA – Carbon Nanotube Composite Fibers.
- [58] Jiang, D. and Li, B. (2009). Novel electrode materials to enhance the bacterial adhesion and increase the power generation in microbial fuel cells (MFCs). *Water Science and Technology*, 59(3) :557–563.
- [59] Kataoka, T., Kitano, T., Sasahara, M., and Nishijima, K. (1978). Viscosity of particle filled polymer melts. *Rheologica Acta*, 17(2) :149–155.
- [60] Katuri, K. P., Kavanagh, P., Rengaraj, S., and Leech, D. (2010). *Geobacter sulfurreducens* biofilms developed under different growth conditions on glassy carbon electrodes : insights using cyclic voltammetry. *Chemical Communications*, 46(26) :4758.
- [61] Ketep, S. F., Bergel, A., Calmet, A., and Erable, B. (2014). Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 7(5) :1633.
- [62] Kim, B.-H., Kim, H.-J., Hyun, M.-S., and Park, D.-H. (1999). Direct electrode reaction of *fe* (iii)-reducing bacterium, *shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2) :127–131.
- [63] Kim, H. J., Park, H. S., Hyun, M. S., Chang, I. S., Kim, M., and Kim, B. H. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2) :145–152.
- [64] Kim, J., Xiong, H., Hofmann, M., Kong, J., and Amemiya, S. (2010). Letters to Analytical Chemistry Scanning Electrochemical Microscopy of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. 82(5) :1605–1607.
- [65] Kirchner, C. N., Träuble, M., and Wittstock, G. (2010). Diffusion and Reaction in Microbead Agglomerates S1 Formation of bead agglomerates in an array. 82(7) :1–20.

Bibliographie

- [66] Kirkpatrick, S. (1973). Percolation and conduction. *Rev. Mod. Phys.*, 45 :574–588.
- [67] Lau, C., Cooney, M. J., and Atanassov, P. (2008). Conductive macroporous composite chitosan-carbon nanotube scaffolds. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(13) :7004–10.
- [68] Lee, M.-Y., Kumar, R. A., Sukumaran, S. M., Hogg, M. G., Clark, D. S., and Dordick, J. S. (2008). Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1) :59–63.
- [69] Lewis, K. (1966). Symposium on bioelectrochemistry of microorganisms. IV. Biochemical fuel cells. *Bacteriological reviews*, 30(1) :101–13.
- [70] Lin, C. C. and Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations : Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13) :1379–1408.
- [71] Lin, J., Tang, Q., Wu, J., and Hao, S. (2007). The synthesis and electrical conductivity of a polyacrylate/graphite hydrogel. *Reactive and Functional Polymers*, 67(4) :275–281.
- [72] Lin, W. C., Coppi, M. V., and Lovley, D. R. (2004). *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Applied and environmental microbiology*, 70(4) :2525–8.
- [73] Liu, H., Ramnarayanan, R., and Logan, B. E. (2004). Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology*, 38(7) :2281–2285.
- [74] Liu, X. W., Huang, Y. X., Sun, X. F., Sheng, G. P., Zhao, F., Wang, S. G., and Yu, H. Q. (2014). Conductive carbon nanotube hydrogel as a bioanode for enhanced microbial electrocatalysis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(11) :8158–8164.
- [75] Liu, Y., Kim, H., Franklin, R., and Bond, D. R. (2010). Gold line array electrodes increase substrate affinity and current density of electricity-producing *G. sulfurreducens* biofilms. *Energy & Environmental Science*, 3(11) :1782.
- [76] Logan, B. E. (2004). Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environmental Science and Technology*, 38.
- [77] Logan, B. E. (2012). Essential Data and Techniques for Conducting Microbial Fuel Cell and other Types of Bioelectrochemical System Experiments. *ChemSusChem*, 5(6) :988–94.
- [78] Logan, B. E. and Rabaey, K. (2012). Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6095) :686–90.
- [79] Logan, B. E. and Regan, J. M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 14(12) :512–518.

- [80] Lovley, D. R. and Phillips, E. J. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism : organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and environmental microbiology*, 54(6) :1472–1480.
- [81] Luckarift, H. R., Sizemore, S. R., Farrington, K. E., Roy, J., Lau, C., Atanassov, P. B., and Johnson, G. R. (2012). Facile fabrication of scalable, hierarchically structured polymer/-carbon architectures for bioelectrodes. *ACS applied materials & interfaces*, 4(4) :2082–7.
- [82] MacDonald, R. a., Voge, C. M., Kariolis, M., and Stegemann, J. P. (2008). Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels. *Acta biomaterialia*, 4(6) :1583–92.
- [83] Macosko, C. W. (1994). *Rheology : Principle, Measurements and Applications*. Wiley -VCH.
- [84] Mahadevan, R., Palsson, B. O., and Lovley, D. R. (2011). In situ to in silico and back : elucidating the physiology and ecology of *Geobacter* spp. using genome-scale modelling. *Nature reviews. Microbiology*, 9(1) :39–50.
- [85] Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., and Bond, D. R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10) :3968–73.
- [86] Mason, M. N., Metters, A. T., Bowman, C. N., and Anseth, K. S. (2001). Predicting Controlled-Release Behavior of Degradable PLA- b -PEG- b -PLA Hydrogels. *Macromolecules*, 34(13) :4630–4635.
- [87] Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., and Heyman, J. A. (2013). Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature protocols*, 8(5) :870–891.
- [88] Mehta, T., Coppi, M. V., Childers, S. E., and Lovley, D. R. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and environmental microbiology*, 71(12) :8634–41.
- [89] Mukherjee, S., Su, S., Panmanee, W., Irvin, R. T., Hassett, D. J., and Choi, S. (2013). A microliter-scale microbial fuel cell array for bacterial electrogenic screening. *Sensors and Actuators A : Physical*, 201 :532–537.
- [90] Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., Haft, D. H., Selengut, J., Davidsen, T. M., Zafar, N., White, O., Tran, B., Romero, C., Forberger, H. A., Weidman, J., Khouri, H., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Aken, S. E. V., Lovley, D. R., and Fraser, C. M. (2011). Genome of *Geobacter sulfurreducens* : Metal Reduction in Subsurface Environments. 302(December 2003) :1967–1969.

Bibliographie

- [91] Noël, J.-M. (2011). *Analyse dynamique de surfaces fonctionnelles par électrochimie localisée*. PhD thesis, Université de Rennes 1.
- [92] Noël, J.-M., Mottet, L., Bremond, N., Poulin, P., Combellas, C., Bibette, J., and Kanoufi, F. (2015). Multiscale electrochemistry of hydrogels embedding conductive nanotubes. *Chem. Sci.*, 6(7) :3900–3905.
- [93] O’Connell, M. J. O., Bachilo, S. M., Huffman, C. B., Rialon, K. L., Boul, P. J., and Noon, W. H. (2002). Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. 297(July) :593–597.
- [94] Oldham, K. B. (2008). A Gouy-Chapman-Stern model of the double layer at a (metal)/(ionic liquid) interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 613(2) :131–138.
- [95] Osman, M. H., Shah, a. a., and Walsh, F. C. (2010). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II : Microbial. *Biosensors & bioelectronics*, 26(3) :953–63.
- [96] Palmer, J., Flint, S., and Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9) :577–588.
- [97] Park, J. K. and Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. 18 :303–319.
- [98] Pedrosa, V. A., Gnanaprakasa, T., Balasubramanian, S., Olsen, E. V., Davis, V. A., and Simonian, A. L. (2009). Electrochemical properties of interface formed by interlaced layers of DNA- and lysozyme-coated single-walled carbon nanotubes. *Electrochemistry Communications*, 11(7) :1401–1404.
- [99] Pellet, C. and Cloitre, M. (2015). Glass transition and jamming in soft colloids. *To Be published*.
- [100] Peters, J. E., Thate, T. E., and Craig, N. L. (2003). Definition of the Escherichia coli MC4100 Genome by Use of a DNA Array Definition of the Escherichia coli MC4100 Genome by Use of a DNA Array. *Society*, 185(6) :2017–2021.
- [101] Poncharal, P., Wang, Z. L., Ugarte, D., and Heer, W. A. D. (1999). Electrostatic Deflections and Electromechanical Resonances of Carbon Nanotubes. 283(March) :1513–1516.
- [102] Potter, K., Balcom, B. J., Carpenter, T., and Hall, L. D. (1994). The gelation of sodium alginate with calcium ions studied by magnetic resonance imaging (MRI). *Carbohydrate Research*, 257(1) :117–126.
- [103] Prescott, L. M., Harley, J. P., and D.A., K. (2003). *Microbiologie*. De Boeck SupÃrieur.
- [104] Qian, F. and Morse, D. E. (2011). Miniaturizing microbial fuel cells. *Trends in biotechnology*, 29(2) :62–9.

-
- [105] Qu, B., Li, J.-r., Xiao, H.-n., He, B.-h., and Qian, L.-y. (2015). Facile preparation and characterization of sodium alginate/graphite conductive composite hydrogel. *Polymer Composites*.
- [106] Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., and Verstraete, W. (2005). Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environmental science & technology*, 39(20) :8077–82.
- [107] Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045) :1098–101.
- [108] Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L., and Lovley, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and environmental microbiology*, 72(11) :7345–8.
- [109] Reimers, C. E., Tender, L. M., Fertig, S., and Wang, W. (2001). Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *Environmental science & technology*, 35(1) :192–195.
- [110] Ren, Z., Ward, T. E., and Regan, J. M. (2007). Electricity Production from Cellulose in a Microbial Fuel Cell Using a Defined Binary Culture. *Environmental Science & Technology*, 41(13) :4781–4786.
- [111] Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K. P., Johnson, J. P., Rotello, V. M., and Lovley, D. R. (2008). Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(8) :4376–9.
- [112] Roland, C. M. (1990). Dynamic mechanical behavior of filled rubber at small strains. *Journal of Rheology*, 34(1) :25.
- [113] Rolland, L. (2013). *Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à cœur liquide*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie.
- [114] Rolland, L., Santanach-Carreras, E., Delmas, T., Bibette, J., and Bremond, N. (2014). Physicochemical properties of aqueous core hydrogel capsules. *Soft matter*, pages 9668–9674.
- [115] Saito, R., Dresselhaus, G., and Dresselhaus, M. (1998). *Physical properties of carbon nanotubes*. Imperial College Press , London.
- [116] Shaffer, M. S. P. and Windle, A. H. (1999). Fabrication and Characterization of Carbon Nanotube / Poly (vinyl alcohol) Composites. pages 937–941.
- [117] Shelford, A. V. E. (1931). Some Concepts of Bioecology. 12(3) :455–467.
- [118] Shen, M., Ishimatsu, R., Kim, J., and Amemiya, S. (2012). Quantitative imaging of ion transport through single nanopores by high-resolution scanning electrochemical microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 134(24) :9856–9859.

Bibliographie

- [119] Shrestha, P. M., Rotaru, A.-E., Akhujkar, M., Liu, F., Shrestha, M., Summers, Z. M., Malvankar, N., Flores, D. C., and Lovley, D. R. (2013). Syntrophic growth with direct interspecies electron transfer as the primary mechanism for energy exchange. *Environmental microbiology reports*, 5(6) :904–10.
- [120] Snowden, M. E., Edwards, M. a., Rudd, N. C., Macpherson, J. V., and Unwin, P. R. (2013). Intrinsic electrochemical activity of single walled carbon nanotube-Nafion assemblies. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 15(14) :5030–8.
- [121] Srikanth, S., Marsili, E., Flickinger, M. C., and Bond, D. R. (2008). Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5) :1065–1073.
- [122] Strano, M. S., Moore, V. C., Miller, M. K., Allen, M. J., Haroz, E. H., Kittrell, C., Hauge, R. H., and Smalley, R. E. (2003). The role of surfactant adsorption during ultrasonication in the dispersion of single-walled carbon nanotubes. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 3(1-2) :81–86.
- [123] Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., and Lovley, D. R. (2010). Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 330(6009) :1413–1415.
- [124] Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., and Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria-molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pages 8481–8495.
- [125] Tang, X., Li, H., Du, Z., Wang, W., and Ng, H. Y. (2015). Conductive polypyrrole hydrogels and carbon nanotubes composite as an anode for microbial fuel cells. *RSC Adv.*, 5(63) :50968–50974.
- [126] Thess, A., Lee, R., Nikolaev, P., Dai, H., Petit, P., Xu, C., Lee, Y. H., Kim, S. G., Rinzler, A. G., Colbert, D. T., Scuseria, G. E., Tománek, D., Fischer, J. E., Smalley, R. E., Robert, J., and Tomanek, D. (1996). Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. 273(5274) :483–487.
- [127] Tjong, S. C., Liang, G. D., and Bao, S. P. (2007). Electrical behavior of polypropylene/multiwalled carbon nanotube nanocomposites with low percolation threshold. *Scripta Materialia*, 57(6) :461–464.
- [128] Tomasi, R., Noël, J.-M., Zenati, A., Ristori, S., Rossi, F., Cabuil, V., Kanoufi, F., and Abou-Hassan, A. (2014). Chemical communication between liposomes encapsulating a chemical oscillatory reaction. *Chemical Science*, pages 1854–1859.
- [129] Treacy, M. M. J., Ebbesen, T. W., and Gibson, J. M. (1996). Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature*, 381(6584) :678–680.
- [130] Tremillon, B. (1993). *Électrochimie analytique et réaction en solution. Tome 2*. Masson, Paris.

- [131] Uludag, H., De Vos, P., and Tresco, P. a. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced drug delivery reviews*, 42(1-2) :29–64.
- [132] Utada, a. S., Lorenceau, E., Link, D. R., Kaplan, P. D., Stone, H. a., and Weitz, D. a. (2005). Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721) :537–541.
- [133] Verstraete, W. and Rabaey, K. (2006). Critical Review Microbial Fuel Cells : Methodology and Technology. *40(17)* :5181–5192.
- [134] Vigolo, B., Coulon, C., Maugey, M., Zakri, C., and Poulin, P. (2005). An experimental approach to the percolation of sticky nanotubes. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5736) :920–923.
- [135] Wagner, D. H. (1998). Stress-Induced Fragmentation of Multi-Walled Carbon Nanotubes in a Polymer Matrix. (August 2015) :1–4.
- [136] Walser, M., Leibundgut, R. M., Pellaux, R., Panke, S., and Held, M. (2008). Isolation of monoclonal microcarriers colonized by fluorescent E. coli. *Cytometry Part A*, 73(9) :788–798.
- [137] Walters, D. A., Ericson, L. M., Casavant, M. J., Liu, J., Colbert, D. T., Smith, K. A., and Smalley, R. E. (1999). Elastic strain of freely suspended single-wall carbon nanotube ropes. *Applied Physics Letters*, 74(25).
- [138] Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2011). Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(20) :9335–9344.
- [139] Westrin, B. A. and Zacchi, G. (1991). Beads : Random and systematic errors. *46(8)* :1911–1916.
- [140] Wichterle, O. and Lím, D. (1960). Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*, 185(4706) :117–118.
- [141] Wilson, N. R., Guille, M., Dumitrescu, I., Fernandez, V. R., Rudd, N. C., Williams, C. G., Unwin, P. R., and Macpherson, J. V. (2006). Assessment of the electrochemical behavior of two-dimensional networks of single-walled carbon nanotubes. *Analytical chemistry*, 78(19) :7006–15.
- [142] Xie, X., Hu, L., Pasta, M., Wells, G. F., Kong, D., Criddle, C. S., and Cui, Y. (2011). Three-dimensional carbon nanotube-textile anode for high-performance microbial fuel cells. *Nano letters*, 11(1) :291–6.
- [143] Yi, H., Nevin, K. P., Kim, B.-C., Franks, A. E., Klimes, A., Tender, L. M., and Lovley, D. R. (2009). Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosensors & bioelectronics*, 24(12) :3498–503.
- [144] Yu, M.-f., Lourie, O., Dyer, M. J., Moloni, K., Kelly, T. F., and Ruoff, R. S. (2000). Strength and Breaking Mechanism of Multiwalled Carbon Nanotubes Under Tensile Load. *287(January)* :637–640.

Bibliographie

- [145] Zanello, P. (2003). *Inorganic Electrochemistry : Theory, Practice and Application*. The Royal society of Chemistry.
- [146] Zhang, L. and Shi, G. (2011). Preparation of highly conductive graphene hydrogels for fabricating supercapacitors with high rate capability. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(34) :17206–17212.
- [147] Zou, Y., Xiang, C., Yang, L., Sun, L.-X., Xu, F., and Cao, Z. (2008). A mediatorless microbial fuel cell using polypyrrole coated carbon nanotubes composite as anode material. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(18) :4856–4862.

Hydrogel composite conducteur pour l'encapsulation de bactéries électroactives

Ce travail de thèse concerne la création d'un nouveau réacteur biocompatible permettant l'encapsulation et l'étude de bactéries électroactives. Ce compartiment, réalisé par millifluidique, est une capsule à cœur liquide possédant une membrane d'hydrogel conducteur. Pour cela, nous avons formulé un hydrogel composite alginate/nanotube de carbone en deux étapes. Une première étape rapide crée la matrice d'hydrogel par diffusion d'ions divalents dans un mélange alginate/nanotubes de carbone. Une seconde étape, plus lente, permet la dialyse du tensioactif stabilisant les nanotubes et la création d'un réseau conducteur au sein de l'hydrogel pour des pourcentages massiques supérieurs à 0,5 %. Ce matériau composite présente alors une conductivité macroscopique de $0,1 \text{ S.m}^{-1}$. Une étude du matériau par voie électrochimique permet entre autres de suivre cinétiquement connexion des nanotubes de carbone dans l'hydrogel. Cette hydrogel conducteur se comporte à terme comme une électrode poreuse et autorise le développement de biofilms bactériens électroactifs à sa surface. Il est ensuite utilisé pour la création de capsules à membrane conductrice biocompatibles. Nous démontrons qu'il est alors possible de mesurer l'électroactivité d'un biofilm de bactéries développé sur la paroi interne de la capsule. Ce nouveau compartiment ouvre la voie vers le développement d'un outil de criblage et la sélection de bactéries électroactives mais offre également des perspectives innovantes dans la fabrication des biopiles.

Mots clefs : Hydrogel - Composite - Conducteur - Nanotubes de carbone - Tensioactifs - Alginate - Encapsulation - Bactéries - Piles microbiennes

Conducting composite hydrogel for the encapsulation of electroactive bacteria

This work focuses on the creation of a new biocompatible reactor allowing the encapsulation and the study of electroactive bacteria. Made by millifluidic, this bioreactor is shaped as a liquid core capsule with a conducting hydrogel membrane. For this purpose, we formulated a composite hydrogel of alginate/carbon nanotubes in two steps. The first step is rapid and creates the hydrogel matrix by diffusion of divalent ions inside the alginate/carbon nanotube mix. The second step is slower and deals with the dialysis of the surfactant used to stabilised the nanotubes. This step triggers the creation of a conducting network in the hydrogel for weight percentage above 0.5%. This composite material has a macroscopic conductivity around 0.1 S.m^{-1} . An electrochemical study of this material allows to follow the nanotube connection in the hydrogel. This conducting hydrogel behaved like a porous electrode and authorize the developpement of a bacterial electroactive biofilm on its surface. Then, it is used to create biocompatible capsule with conducting membrane. We demonstrate that the electroactivity of a biofilm developped on the inner part of the capsule shell can be measured. This new reactor opens the way toward the development of a screening tool and the selection of electroactive bacteria but also brings innovative outlooks in the biofuel cells fabrication.

Key words : Hydrogel - Composite - Carbon nanotubes - Surfactant - Alginate - Encapsulation - Bacteria - Microbial fuel cells - Alginate