



**HAL**  
open science

# Élaboration d'un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel pour la culture de bactéries

Jessica Kui

► **To cite this version:**

Jessica Kui. Élaboration d'un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel pour la culture de bactéries. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS051 . tel-03708877

**HAL Id: tel-03708877**

**<https://theses.hal.science/tel-03708877v1>**

Submitted on 29 Jun 2022

**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 Sorbonne Université

Ecole Doctorale 388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

*Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés – ESPCI Paris*

## **Élaboration d'un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel pour la culture de bactéries**

*Development of a hydrogel-based tubular bioreactor to  
cultivate bacteria*

Présentée par

Jessica KUI

Dirigée par Nicolas BREMOND

Présentée et soutenue publiquement le 18 mars 2022

Devant un jury composé de :

Mme. Gladys MASSIERA	Professeur à l'Université de Montpellier	Rapportrice
M. Philippe POULIN	Directeur de recherche au CRPP	Rapporteur
M. Laurent CORTE	Professeur à l'Ecole des Mines de Paris	Examinateur
M. Nicolas BREMOND	Maitre de conférences à l'ESPCI	Directeur de thèse





## Remerciements

Réaliser une thèse de doctorat a été pour moi une expérience extrêmement enrichissante à la fois scientifiquement et personnellement. Il y a eu des moments faciles où les expériences se passaient bien, où j’obtenais des résultats encourageants rapidement, mais il y a également eu des moments plus difficiles que j’ai pu surmonter grâce au soutien quotidien des personnes que je tiens à remercier ici.

J’aimerais dans un premier temps remercier les membres du jury. Merci à Mme. Gladys MASSIERA et M. Philippe POULIN d’avoir accepté le rôle de rapporteurs et d’avoir lu avec attention ma thèse. Vos commentaires ainsi que la discussion qui a suivi la soutenance ont permis de soulever des questions très intéressantes auxquelles je n’avais pas pensées. Merci également au président du jury M. Laurent CORTE qui a aussi été le responsable de mon M2. C’est grâce à mon stage de M2 que j’ai découvert le LCMD et que j’y suis restée par la suite pour une incroyable aventure.

Merci aussi à Ludovic OLANIER pour la conception et l’usinage de la chambre de flux ainsi que pour l’impression rapide de nombreuses pièces en 3D.

J’aimerai maintenant remercier les membres du laboratoire, en commençant par Jérôme BIBETTE, directeur du LCMD, pour m’avoir accueillie au laboratoire.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse Nicolas BREMOND, ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi. Merci de m’avoir accueillie pour mon stage de M2 sur un projet vraiment intéressant qui m’a poussée à vouloir continuer en doctorat sur un sujet similaire. Tu m’as confié ce projet très ambitieux et malgré les difficultés liées, entre autres, aux travaux à l’ESPCI générant des vibrations, ta patience et tes encouragements m’ont permis de réussir cette thèse. Merci de ton encadrement bienveillant et de ta disponibilité, en particulier durant la rédaction du manuscrit qui n’a pas été facile. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, il y a maintenant quatre ans, je n’avais pas cette confiance que j’ai aujourd’hui et c’est en grande partie grâce à ton accompagnement.

Je remercie également Jean BAUDRY pour son implication dans ma thèse et les nombreuses discussions concernant la microbiologie, et particulièrement pour sa disponibilité et ses précieux conseils, surtout lors de la préparation de la soutenance.

Un grand merci à Florence CONDAMINE pour tellement de choses qui ont rendu le temps que j’ai passé au laboratoire plus facile et agréable. Tu as toujours su trouver une solution à mes problèmes, que ce soit de science ou d’ordre personnel, et j’ai beaucoup apprécié toutes nos discussions. Sans toi, cette thèse n’aurait pas été la même.

Je remercie Isabelle BORSENBARGER et Hélène DODIER, grâce à qui mes expériences ont pu être faites en temps et en heure. Merci à vous deux d’être aussi efficaces

au travail mais aussi à votre gentillesse. Merci à toi Isa d'être toujours à l'écoute, et Hélène, je t'ai nourrie de carrés de chocolat avec plaisir !

Je souhaite maintenant remercier toutes les personnes incroyables que j'ai pu rencontrer au laboratoire. Je vais faire cela dans l'ordre chronologique de notre rencontre car vous êtes beaucoup, et je tiens à n'oublier personne. Merci à toi Wafa de m'avoir accueillie comme stagiaire et de m'avoir formée sur le procédé d'encapsulation. Un grand merci à Gwen pour nos longues discussions toujours sérieuses peu importe le sujet, et de m'avoir accueillie comme une grande soeur dans le labo. Merci aussi Bettina pour ta bonne humeur, les massages et les discussions très animées à midi. Un énorme merci à Aurore qui a su m'intégrer à la vie sociale du laboratoire, merci de ta gentillesse, de ta sagesse, de ton réconfort dans les moments difficiles, des conseils et du temps qu'on a passé à parler de tout et de rien. Finalement, grâce à cette amitié, je me suis trouvé une soeur de coeur. Léo, merci pour ta patience et ton écoute lorsque la motivation n'était pas au maximum. Jérôme, merci pour les moments geek autour de Pikachu et des mangas. Paul, nous avons commencé notre thèse le même jour, et nous l'avons soutenue à quelques jours d'écart. Avec tous ses hauts et ses bas, cette aventure n'aurait pas été la même sans ta présence et ton soutien moral. Merci Wilfried pour ta bienveillance et ta bonne humeur. Claire tu es une personne brillante et tu as toujours une réponse à toutes mes questions scientifiques, merci pour ta sincérité et ta gentillesse. Sariyeh, tu étais la collègue discrète du bureau à ton arrivée et finalement tu es devenue une amie et une confidente : toujours prête à m'aider, un immense merci du fond du coeur. Alexandre, merci beaucoup pour ton écoute et tes conseils avisés, et surtout les débats à midi. Cyrielle, les bons moments que l'on a passé au sport ou au labo à discuter du sang des licornes que tu as tuées pour faire tes expériences me manqueront beaucoup, merci d'avoir partagé ton énergie positive avec moi. Merci aussi à Eren, Pablo, Amandine, Maxime, Edgar et Lorenzo avec qui j'ai eu l'occasion de partager un bureau, toujours dans la bonne humeur. Merci à toutes les autres membres du laboratoire : Ankur, Antu, Danial, Elie, Edouard, Abdul, Jean-Baptiste, Sylvie, Joachim, Noushin, Erwan, Arthur, Guilhem, Magda, Nathan, Matin, ainsi que les membres de Cyprio et Kapsara avec qui j'ai eu le plaisir d'interagir. Merci aussi à Guillaume et Arslane, mes stagiaires, grâce à qui j'ai pu obtenir beaucoup de résultats.

Enfin, j'aimerais remercier mes proches qui m'ont écouté raconter ma science sans forcément tout comprendre. Merci à Diane, Peter, Marion, Lili et Clémentine, mes amis de toujours pour votre soutien et votre énergie positive. Merci Louise, Helena et Lydie, mes copines doctorantes avec qui j'ai pu partager mes petits malheurs et mes frustrations. Un énorme merci à toi Antoine qui m'a écouté me plaindre et m'émerveiller ces dernières années, pour ta patience et tes encouragements. Pour finir, j'aimerais

remercier ma famille. D'abord mes parents et mes grand parents, qui m'ont toujours encouragée à poursuivre mes rêves et qui ont fait tout ce qu'ils pouvaient pour m'offrir une meilleure vie. Sans eux, cette réussite n'aurait pas été possible. Typhanie et Jacky, grâce à vos petites attentions dans la vie quotidienne j'ai pu avoir des moments de détente et de rire qui ont été indispensables durant le stress de la fin. Enfin, j'ai une pensée spéciale pour mon Papi dont le rêve de toujours a été que je fasse de longues études. Tu n'as pas pu assister à ma soutenance, mais tu nous a quitté avec fierté en sachant que j'étais devenue la première Docteure de notre famille, je te dédie cette thèse.

## Résumé

Cette thèse décrit la conception et la mise en place d'un bioréacteur tubulaire en hydrogel pour la culture de bactéries. Des tubes d'hydrogel sont formés par un procédé de coextrusion à bas débit d'une solution visqueuse de polymère d'alginate et d'une solution interne aqueuse dans un bain gélifiant contenant des cations divalents qui est placé à distance variable de la buse d'extrusion. Les propriétés géométriques et la stabilité d'un tel pont liquide dépendent notamment du débit d'extrusion et de la composition du fluide de cœur qui à leur tour déterminent les caractéristiques du tube d'hydrogel ainsi formé. La formation du tube résulte d'une compétition entre l'étalement de la solution d'alginate à la surface libre du bain et de la transition sol-gel induite par la diffusion des cations depuis le bain. L'utilisation du baryum pour gélifier l'alginate permet d'obtenir un hydrogel stable dans des conditions physiologiques de culture microbienne mais conduit à un hydrogel hétérogène, notamment en lien avec le traitement thermique pour stériliser la solution d'alginate, rendant alors les tubes non fonctionnels. La gélification de l'alginate par du calcium, conduisant à un hydrogel homogène, puis une étape d'échange ionique par du baryum permet alors d'obtenir des tubes mécaniquement et thermodynamiquement stables ainsi que transparents. Par la suite, les tubes sont placés dans une cellule de flux possédant une fenêtre d'observation afin de pouvoir les perfuser mais également d'induire un écoulement du milieu de culture extérieur au contact de la membrane semi-perméable que constitue l'hydrogel. Il est ainsi possible de cultiver bactéries sur plusieurs jours. Ce bioréacteur original offre un nouvel outil pour la microbiologie avec notamment la possibilité de créer un gradient de concentration d'un soluté depuis l'extérieur pour des expériences d'évolution et d'adaptation de microorganismes.

Mots clés : coextrusion ; pont liquide, alginate ; hydrogel ; bioréacteur ; bactéries

## Abstract

This thesis describes the design and implementation of a tubular hydrogel bioreactor to cultivate bacteria. Hydrogel tubes are formed by a process of low flowrate coextrusion of an external viscous solution of alginate polymer and an aqueous internal solution in a gelling bath containing divalent cations which is placed at variable distance from the extrusion nozzle. The geometric properties and the stability of such a liquid bridge depend on the extrusion rate and on the composition of the core fluid, which in turn determine the characteristics of the hydrogel tube. The formation of the tube results from a competition between the spreading of the alginate solution on the free surface of the bath and the sol-gel transition induced by the diffusion of cations from the bath. The use of barium to gel a heat-sterilized alginate solution makes it possible to obtain a stable hydrogel under physiological conditions of microbial culture but leads to a heterogeneous hydrogel, thus making the tubes not functional. The gelation of the alginate with calcium, resulting in a homogeneous hydrogel, followed by an ion exchange step with barium makes it possible to obtain transparent tubes that are mechanically and thermodynamically stable. Subsequently, the tubes are placed in a flow cell having an observation window in order to be able to perfuse them but also to induce a flow of the external culture medium in contact with the semi-permeable membrane constituted by the hydrogel, allowing the culture of bacteria over several days. This original bioreactor offers a new tool for microbiology with the possibility of creating a concentration gradient of a solute from the outside for evolution experiments on the adaptation of microorganisms.

Keywords : coextrusion ; liquid bridge, alginate ; hydrogel ; bioreactor ; bacteria



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction Générale</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>État de l'art</b>	<b>15</b>
2.1	L'architecture tubulaire chez les mammifères . . . . .	15
2.1.1	Le système digestif et son microbiote . . . . .	16
2.2	Des tubes semi-perméables en hydrogel . . . . .	19
2.2.1	Les hydrogels . . . . .	19
2.2.1.1	Hydrogels chimiques . . . . .	19
2.2.1.2	Hydrogels physiques . . . . .	20
2.2.1.3	Origine du polymère . . . . .	20
2.2.1.3.1	Polymères d'origine naturelle . . . . .	20
2.2.1.3.2	Polymères d'origine synthétique . . . . .	21
2.2.1.4	Propriétés physico-chimiques de l'hydrogel . . . . .	22
2.2.2	Méthodes de fabrication . . . . .	23
2.3	Un outil pour étudier l'évolution bactérienne . . . . .	25
2.3.1	Notion d'évolution dirigée . . . . .	25
2.3.1.1	Définition d'un bioréacteur . . . . .	26
2.3.2	Culture dans un bioréacteur à compartiment fermé . . . . .	27
2.3.3	Un bioréacteur ouvert en flux . . . . .	28
2.4	Objectifs de la thèse . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Procédé d'extrusion de tubes d'hydrogel</b>	<b>31</b>
3.1	Introduction . . . . .	31
3.2	Matériel et Méthode . . . . .	31
3.2.1	L'alginate . . . . .	31
3.2.1.1	La transition sol-gel . . . . .	32
3.2.1.2	Préparation des solutions . . . . .	34
3.2.2	Dispositif expérimental . . . . .	35
3.2.3	Premières observations . . . . .	38

3.2.3.1	Régime de jet liquide impossible . . . . .	38
3.2.3.2	Importance de la densité des solutions . . . . .	41
3.3	Description de l'extrusion dans l'eau . . . . .	42
3.3.1	Stabilité du pont liquide dans l'eau . . . . .	42
3.3.1.1	Analyse théorique . . . . .	43
3.3.1.1.1	Pont liquide statique . . . . .	43
3.3.1.1.2	Pont liquide dynamique . . . . .	46
3.3.2	Pas de formation de jet dans un bain d'eau . . . . .	51
3.4	Extrusion dans un bain de calcium . . . . .	53
3.4.1	Extrusion d'une fibre d'alginate . . . . .	53
3.4.1.1	Proposition d'un mécanisme de formation de la fibre . . . . .	54
3.4.1.2	Influence de la concentration en calcium dans le bain . . . . .	56
3.4.2	Co-extrusion d'un tube d'alginate . . . . .	57
3.4.2.1	Stabilisation de l'interface interne du tube . . . . .	59
3.5	Conclusion . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Ajustement des propriétés de l'hydrogel</b>	<b>65</b>
4.1	Introduction . . . . .	65
4.2	Perfuser un tube d'alginate . . . . .	66
4.2.1	Matériel et méthodes . . . . .	68
4.2.1.1	Adhésion d'une bille d'alginate sur une lame de verre . . . . .	68
4.2.1.1.1	Préparation des lames de verre . . . . .	68
4.2.1.1.2	Préparation des billes d'alginate . . . . .	68
4.2.1.1.3	Protocole d'adhésion d'une bille d'alginate sur une lame de verre . . . . .	69
4.2.1.2	Adhésion d'un tube d'alginate sur un capillaire en verre . . . . .	69
4.2.1.2.1	Préparation des capillaires de verre . . . . .	69
4.2.1.2.2	Préparation des tubes d'alginate . . . . .	70
4.2.1.2.3	Protocole d'adhésion d'un tube d'alginate sur un capillaire en verre . . . . .	71
4.2.2	Résultats et discussion . . . . .	71
4.2.2.1	Étude de l'adhésion d'une bille d'alginate sur une lame de verre . . . . .	71
4.2.2.1.1	Fonctionnalisation de la surface par l'amino- silane . . . . .	71
4.2.2.1.2	Fonctionnalisation de la surface par la poly- L-lysine . . . . .	73

4.2.2.2	Étude de l'adhésion d'un tube d'alginate sur un capillaire en verre . . . . .	75
4.2.2.2.1	Expérience dans de l'eau . . . . .	75
4.2.2.2.2	Expérience préliminaire de culture . . . . .	76
4.2.3	Conclusions . . . . .	77
4.3	Re-formulation de l'hydrogel . . . . .	77
4.3.1	Comparaison de l'alginate de calcium et l'alginate de baryum . . . . .	78
4.3.1.1	Influence de la purification de l'alginate . . . . .	79
4.3.1.2	Comportement de l'hydrogel dans les conditions physiologiques . . . . .	81
4.3.1.3	Étude sur les tubes . . . . .	84
4.3.1.4	Conclusions . . . . .	85
4.3.2	Échange ionique : de l'alginate de calcium vers un alginate de baryum . . . . .	85
4.3.3	Protocole de fabrication d'un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel . . . . .	87
4.4	Conclusion . . . . .	87
<b>5</b>	<b>Bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel</b>	<b>89</b>
5.1	Introduction . . . . .	89
5.2	Application du bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel . . . . .	94
5.2.1	Matériel et méthodes . . . . .	94
5.2.1.1	Produits chimiques . . . . .	94
5.2.1.2	Souches bactériennes . . . . .	95
5.2.1.3	Support de culture . . . . .	95
5.2.1.3.1	Boîte de pétri modifiée . . . . .	95
5.2.1.3.2	Cellule de flux en acier inoxydable . . . . .	96
5.2.2	Résultats et discussion . . . . .	99
5.2.2.1	Expériences préliminaires . . . . .	99
5.2.2.2	Culture statique . . . . .	99
5.2.2.2.1	Optimisation du protocole de culture statique . . . . .	103
5.2.3	Conclusion et perspectives . . . . .	105
<b>6</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>107</b>



# Chapitre 1

## Introduction Générale

Ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont intéressés au lien qui relie le microbiote intestinal au bon fonctionnement physiologique de son hôte [1, 2, 3]. Puisqu'un défi majeur dans l'étude du microbiote intestinal humain est la difficulté d'accès au système digestif, beaucoup d'études ont été réalisées sur un modèle animal [4]. Il est important de noter que même si l'expérimentation animale apporte de nombreuses informations essentielles, une corrélation directe avec la physiologie humaine ne peut pas toujours être établie à cause des différences physiologiques et de composition du microbiome de l'animal. Il semble donc important de développer des méthodes *in vitro* afin de reproduire avec plus de réalisme ce qu'il se passe dans le corps humain [5, 6, 7, 8]. Par ailleurs, l'intestin est un organe de géométrie tubulaire qui permet un transport convectif (transport du bol alimentaire) mais aussi un transport diffusif radial permettant l'assimilation des nutriments à travers une longueur de plusieurs mètres où la composition chimique de l'environnement local est différente. L'intestin étant un organe très complexe autant par sa diversité et structure cellulaire que par ses fonctions, il sera modélisé par un tube d'hydrogel semi-perméable permettant la culture de bactéries et sur lequel il est possible d'imposer un gradient de concentration chimique.

À travers ce travail de thèse pluridisciplinaire, nous cherchons à concevoir un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel pour la culture de microorganismes, à l'aide d'un procédé original de fabrication de tubes d'hydrogel d'alginate. La méthode millifluidique par co-extrusion que nous développons permet la production de fibres pleines et de tubes creux à l'échelle millimétriques et à diamètre contrôlé. Cet outil dérive des capsules à cœur liquide qui ont été précédemment développées et caractérisées au laboratoire [9], avec comme différence principale la présence d'une ouverture de part et d'autre de la structure d'hydrogel. Cette ouverture permet une communication directe,

autre que la diffusion, par la perfusion du milieu interne du bioréacteur. L'objectif de ce travail est d'élaborer et caractériser le processus de fabrication d'un bioréacteur fonctionnel permettant la culture de bactéries avec la possibilité de créer un gradient de concentration d'un soluté depuis l'extérieur de la membrane pour permettre des études d'évolution et d'adaptation de microorganismes.

Ce manuscrit de thèse est composé de 4 chapitres qui sont décrits ci-dessous :

Le premier chapitre présente l'état de l'art autour de ce projet de thèse. Dans un premier temps, nous nous intéressons aux structures tubulaires naturelles, en particulier les intestins qui, par leurs fonctions, peuvent être assimilés à une membrane semi-perméable. Dans un second temps, les hydrogels, une catégorie de matériaux idéaux pour la formation de membranes semi-perméables, sont présentés. Enfin, nous définirons ce qu'est un bioréacteur et comment il peut être employé à l'étude de l'évolution dirigée.

Dans le deuxième chapitre, une méthode de production de fibres et de tubes d'alginate à bas débit sera décrite et caractérisée. Cette méthode repose sur la formation d'un pont liquide reliant une buse d'extrusion placée à distance d'un bain de gélification. Par la mesure des propriétés géométriques du pont liquide, l'influence du débit et de la hauteur de l'extrusion ainsi que la présence d'agents gélifiants dans la phase interne sur la géométrie de la surface interne du tube d'hydrogel sont étudiés.

Ensuite, le troisième chapitre présente un protocole pour le montage par adhésion des tubes d'alginate sur des capillaires en verre pour faciliter la manipulation des tubes et permettre leur perfusion. Par la suite, la stabilité de l'hydrogel d'alginate de calcium ou d'alginate de baryum en présence de milieu de culture est étudiée. Enfin, un protocole de gélification par le calcium suivi d'un échange ionique avec du baryum est mis en place et caractérisé en présence de tampons biologiques.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit, décrit l'application des tubes obtenus, par le procédé d'extrusion décrit dans le deuxième chapitre et le traitement post-production décrit dans le troisième chapitre, à la culture de bactéries. Dans un premier temps, la culture en milieu liquide des bactéries utilisées dans cette thèse est caractérisée. Par la suite, le tube d'alginate est placé dans une cellule de flux, possédant une fenêtre d'observation et des canaux d'entrées et de sortie, permettant sa perfusion mais également d'induire un écoulement du milieu de culture extérieur au contact de la membrane semi-perméable que constitue l'hydrogel.

# Chapitre 2

## État de l'art

### 2.1 L'architecture tubulaire chez les mammifères

Les organes tubulaires sont des organes creux délimités par une paroi cellulaire hermétique, par lesquels traversent gaz, fluides et solides. Les nutriments, l'oxygène et toutes autres molécules devant être assimilées par le corps sont capable de passer à travers cette paroi cellulaire par différents mécanismes tels que la diffusion (passive ou active) et la pinocytose, c'est-à-dire l'internalisation par la cellule grâce à la capture vésiculaire de la substance. Ainsi, un organe tubulaire peut être assimilé à une membrane semi-perméable permettant le transport de fluides.

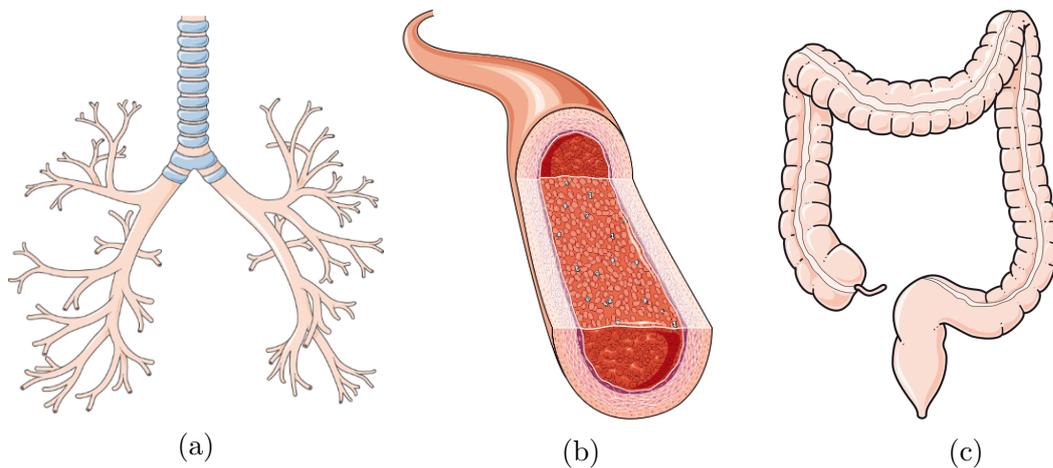


FIGURE 2.1.1 – Représentation schématique de (a) l'arbre trachéo-bronchique, (b) un vaisseau sanguin et (c) le colon

Dans le corps humain, il existe de nombreux organes tubulaires. Nous pouvons citer, entre autres, l'arbre trachéo-bronchique du système respiratoire, les vaisseaux sanguins et le colon, ou gros intestin. Les illustrations de ces organes tubulaires mettent

en évidence une grande variabilité de leurs caractéristiques géométriques telles que leur diamètre ou leur forme (figure 2.1.1). La nature des tissus impliqués dans les organes tubulaires diffère selon son rôle physiologique. En effet, dans le cas des bronches de diamètre important, il s'agit de tissus durs et cartilagineux qui assurent une rigidité de l'organe ; alors que pour les petites bronches, les vaisseaux et le côlon, il s'agit de tissus plus élastiques. La forme de l'organe est déterminée par ses tissus ainsi que sa fonction physiologique. Certains organes tubulaires, comme les vaisseaux sanguins, sont constitués d'un ensemble de tubes de diamètre variable qui sont joints par des intersections, alors que d'autres, comme le côlon, possèdent des replis qui correspondent localement à des zones non-tubulaires [10].

### 2.1.1 Le système digestif et son microbiote

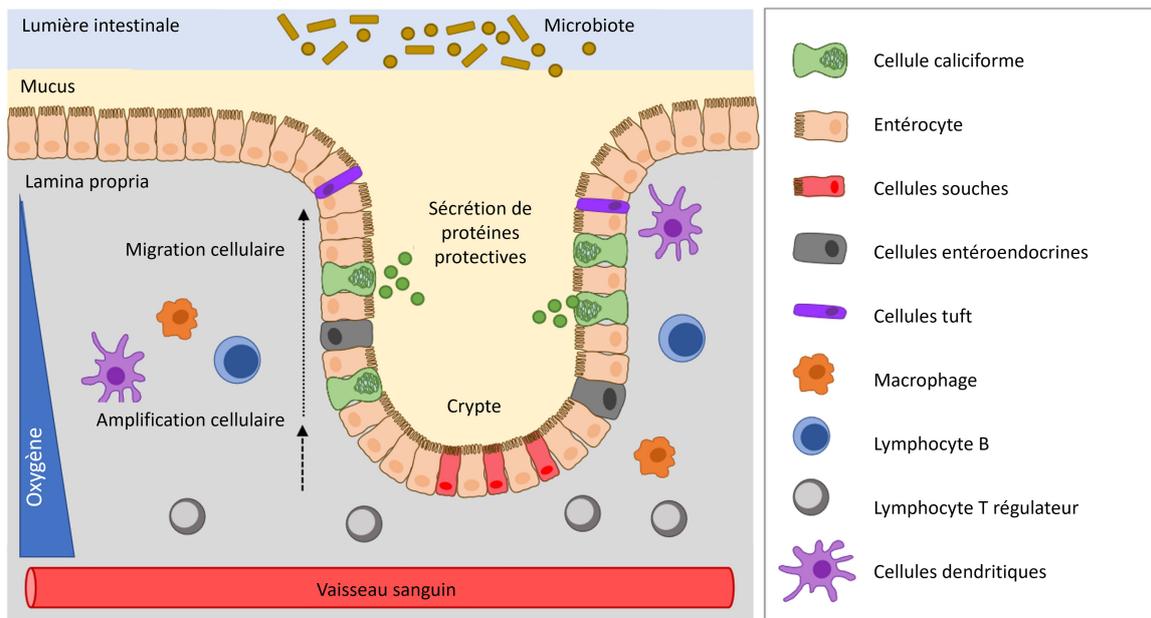


FIGURE 2.1.2 – Composants du gros intestin (colon). Schéma adapté de Ternet et Kiel [11]

Un organe particulièrement intéressant dans sa géométrie et sa diversité biologique est l'intestin, représenté en figure 2.1.2. La surface de l'intestin est recouverte d'un épithélium colonnaire simple, c'est à dire d'une monocouche de cellules en forme de colonne, capable de se régénérer en 5 jours [12] régulant les échanges de nutriments et d'eau et qui assure la défense contre les microbes [13]. Il est composé de cellules épithéliales intestinales qui dérivent des cellules souches intestinales, situées au fond des cryptes. Les cellules souches se différencient aussi en divers types cellulaires telles

que les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines, les cellules tuft, ou les entérocytes [14]. Les cellules caliciformes sécrètent du mucus qui forme une barrière physique protégeant la couche épithéliale, créant ainsi la première ligne de défense de l'épithélium car ces protéines protectrices limitent le contact direct entre l'épithélium et les agents infectieux. Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones en direction du système vasculaire (vaisseau sanguin) alors que le rôle majeur de l'entérocyte est l'absorption de nutriments et la préservation de l'intégrité épithéliale [13]. Toutes ces cellules jouent donc un rôle dans l'homéostasie de la monocouche cellulaire intestinale afin de maintenir sa fonction de barrière qui permet une séparation entre l'environnement externe (vers le microbiote) et l'environnement interne (vers le système vasculaire). L'environnement externe est aussi appelé lumière intestinale, est le creux de l'intestin où transite le bol alimentaire et réside le microbiote intestinal.

À sa naissance, un enfant est entièrement stérile, puis en interagissant avec son environnement et par son alimentation, il développe alors une population de micro-organismes dans son tractus digestif appelé microbiote intestinal qui est le plus grand réservoir de micro-organismes bénéfiques du microbiote humain. Alors que le bol alimentaire est déplacé à travers le système digestif pour être évacué, la persistance des bactéries dans la lumière du colon peut être expliquée par différents facteurs tels que [15] :

- la motilité des bactéries, leur permettant de nager à contre-courant,
- l'apport de bactéries par un réservoir de bactéries adhérentes sur la couche muqueuse de paroi du colon,
- et surtout le péristaltisme, une contraction séquentielle et coordonnée servant à faire progresser les aliments de la bouche jusqu'à l'anus, qui va mélanger le contenu de la lumière du tube. Cette action de mélange va permettre un déplacement à contre-courant de certains éléments, ce qui, couplé avec la croissance bactérienne, maintient un état stationnaire de la densité bactérienne.

Le microbiote possède trois fonctions clés qui sont physiologique, immunitaire et digestive. Il est constitué de diverses espèces de bactéries, virus, parasites et champignons non pathogènes dont la composition et la densité seront différentes selon la position dans le système digestif : bouche, œsophage, estomac, intestin grêle et colon. La figure 2.1.3 représente la composition microbienne dans le tractus digestif. Les conditions chimiques évoluent le long du système digestif, car à mesure que l'on s'approche du colon, la pression en oxygène diminue et le pH est de moins en moins acide : le pH dans l'estomac est de 1-3, alors que dans le petit intestin (ou intestin grêle), le pH augmente pour atteindre 6-7, et pour finir, le pH se neutralise dans le

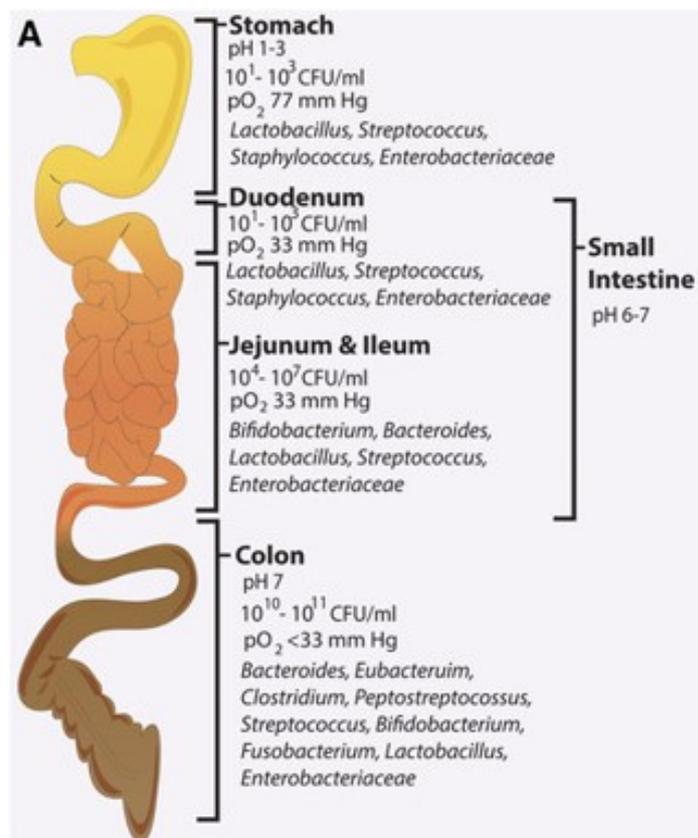


FIGURE 2.1.3 – Schéma de la composition microbienne du tractus digestif selon la localisation [16]

colon (pH= 7). La distribution des micro-organismes peut donc être expliquée par la diversité chimique et physique des micro-habitats. Ainsi, la densité bactérienne est la plus basse dans les zones où le pH est bas et le temps de transit court, situées dans la partie haute du système digestif, alors qu'il y a 10<sup>7</sup> fois plus de bactéries dans le colon où le potentiel redox est faible et le temps de transit est long [4].

De nombreux modèles animaux ont été utilisés pour étudier l'écologie bactérienne du système digestif. Parmi eux nous pouvons citer la souris, le rat et le cochon. Par exemple, le rôle du microbiote a été étudié par la colonisation de manière contrôlée du tube digestif de souris axéniques c'est-à-dire nées et élevées sans exposition à des microbes vivants. L'introduction d'une faune microbienne sélectionnée d'une ou plusieurs espèces ou même de communautés entières provenant de murins normaux ou malades ou d'humains a ainsi montré chez les souris testées que le microbiote intestinal contrôle ou régule la masse osseuse, le stockage des graisses corporelles, l'angiogenèse intestinale et le bon développement de la réponse immunitaire [2]. Ces modèles, bien qu'ayant apporté beaucoup d'informations, restent à interpréter avec précaution car

la physiologie et la composition du microbiome de l'animal restent différentes de celles de l'humain, soulignant la nécessité de développer des modèles *in vitro*.

## 2.2 Des tubes semi-perméables en hydrogel

Un matériau particulièrement adapté à la production d'un outil bio-compatible de forme tubulaire ayant comme fonctions un transport de fluide par convection et une perméabilité permettant la diffusion de molécules vers l'extérieur ou vers l'intérieur du tube est l'hydrogel.

### 2.2.1 Les hydrogels

Un hydrogel est un réseau polymérique tridimensionnel hydrophile, à base de matériaux naturels ou synthétiques, qui peut absorber une masse d'eau de plusieurs milliers de fois sa masse en gélifiant. Le gonflement d'un gel est lié à la présence d'une pression osmotique des macromolécules, en l'absence de laquelle le réseau resterait effondré, et sa résistance à l'écoulement est assurée par des liaisons entre ces dernières [17]. Selon la nature des jonctions, les hydrogels peuvent être stables chimiquement mais peuvent aussi se dégrader et éventuellement se dissoudre [18]. Les hydrogels possèdent des applications dans des domaines très variés tels que les industries agroalimentaire [19], pharmaceutique ou biomédicale [20, 21, 22].

#### 2.2.1.1 Hydrogels chimiques

Un hydrogel est dit "chimique" lorsque le réseau est réticulé par des liaisons covalentes. La transition sol-gel est irréversible, et les caractéristiques du gel sont fixées. Les hydrogels chimiques peuvent être générés depuis des monomères par la polymérisation de ces derniers mais aussi par la réticulation de polymères solubles dans l'eau ou par la conversion de polymères hydrophobes en polymères hydrophiles avant la réticulation [18]. Dans les gels super-absorbants par exemple les macromolécules impliquées sont souvent des polyacrylates de sodium et parfois des polymères portant des groupes sulfates. Les jonctions permanentes peuvent être établies par l'addition de peroxydes ou par irradiation UV mais aussi par la réaction avec des monomères multifonctionnels [17]. Les hydrogels chimiques ne sont pas homogènes et possèdent souvent des régions peu gonflées par l'eau où la densité de réticulation est élevée. Par ailleurs, dans certains cas, en fonction de la composition du solvant, de la température et de la concentration en solides lors de la formation du gel, une séparation de phase peut avoir lieu, formant ainsi des macropores remplis d'eau. Dans les gels chimiques,

une chaîne de polymère libre est considérée comme un défaut dans le réseau car elle ne contribue pas à l'élasticité du réseau permanent [18].

### 2.2.1.2 Hydrogels physiques

Les hydrogels sont dits "réversibles" ou "physiques" lorsque le réseau est maintenu par un enchevêtrement de polymères ou par des forces secondaires telles que les liaisons ioniques, hydrogènes ou hydrophobes. Par exemple, l'ajout de macromolécules de xanthane dans une solution aqueuse, permet par simple enchevêtrement et sans aucune jonction, de former un gel empêchant l'écoulement de la solution. Le mécanisme de formation de jonctions temporaires repose sur l'abaissement de la température ou l'ajout de petites molécules ou d'ions [17]. À cause de leur mode de réticulation, similairement aux hydrogels chimiques, les hydrogels physiques ne sont pas homogènes et les chaînes de polymères libres représentent un défaut dans le réseau transitoire. De plus, lorsqu'un poly électrolyte est combiné à un ion multivalent de charge opposée, un hydrogel physique dit "ionotropique" peut être formé. L'alginate de calcium, qui sera décrit plus spécifiquement par la suite (partie 3.2.1), en est un exemple. Par ailleurs, lorsque deux poly électrolytes de charges opposées sont mélangés, ils peuvent gélifier ou précipiter en fonction de leur concentration, de la force ionique et du pH de la solution, formant des coacervats complexes. Les interactions mises en jeu dans la formation des hydrogels physiques étant réversibles, il est possible de défaire le réseau en modifiant les conditions physiques telles que la force ionique, le pH, la température, en appliquant une contrainte mécanique ou en ajoutant un soluté spécifique qui entre en compétition avec l'agent réticulant [18].

### 2.2.1.3 Origine du polymère

Les hydrogels peuvent être formés à partir de polymères d'origine naturelle, de polymères synthétiques ou bien d'un mélange des deux. Les hydrogels issus de polymères naturels possèdent en général des avantages tels que la bio-compatibilité et la bio-dégradabilité, alors que ceux issus de polymères synthétiques peuvent présenter des propriétés physiques et chimiques intéressantes.

#### 2.2.1.3.1 Polymères d'origine naturelle

Les hydrogels d'origine naturelle, animale ou non, sont largement utilisés car ils sont souvent biodégradables et bio-compatibles, en particulier ceux élaborés à partir de macromolécules qui possèdent souvent des sites d'intérêt pour les cellules (adhésion, dégradation...)[22]. Les hydrogels issus de polymères d'origine animale sont majoritai-

rement à base de protéines telles que le collagène, la laminine, la fibrine ou l'acide hyaluronique. En ingénierie tissulaire, le polymère le plus utilisé est le collagène car il est présent dans la majorité des organismes pluricellulaires et peut être extrait de différentes sources telles que le derme bovin ou le tendon de queue de rat. Sa transition sol-gel est douce car à 37°C et en présence de conditions physiologiques, le collagène existe sous forme de gel. Cependant, en raison de son coût élevé, la gélatine, qui est souvent du collagène dénaturé par traitement acide ou basique, est plus couramment utilisée pour les applications biomédicales. Les polymères d'origine protéique ont l'avantage de pouvoir mimer de nombreuses fonctionnalités de la matrice extracellulaire et ainsi guider la migration, la croissance et l'organisation des cellules lors de la génération du nouveau tissu.

Les polymères d'origine non-animale sont pour la plupart des polysaccharides, comprenant l'alginate, le chitosane ou la cellulose. La cellulose est un polysaccharide qui est biodégradable, bio-compatible, et de faible coût. Il s'agit d'un polysaccharide linéaire dont la réticulation implique des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires. Dans le cas de l'alginate, un polymère extrait de l'algue brune, la transition sol-gel survient en présence de cations divalents qui vont ponter deux chaînes de polymère. Le mécanisme de gélification ainsi que les propriétés physicochimiques de l'hydrogel seront détaillés dans la partie 3.2.1. Le chitosane quand à lui est une molécule positivement chargée lorsqu'elle est en solution, et est obtenu à partir de l'exosquelette des crustacés. La gélification du chitosane peut être de nature chimique ou physique. Les hydrogels formés à partir de polymères obtenus d'une source non animale ne possèdent pas de sites protéiques reconnus par les cellules, et ainsi demanderont une étape de fonctionnalisation supplémentaire s'ils doivent être utilisés pour la culture cellulaire.

Les hydrogels issus de polymères naturels présentent certains désavantages, en particulier leur inhomogénéité intrinsèque due à une variabilité de la composition du polymère qui peut être imprévisible. Ces hydrogels qui sont naturellement biodégradables peuvent être facilement dénaturés et déstabilisés, encourageant grandement la recherche sur les hydrogels de polymères synthétiques permettant de mieux contrôler les propriétés de l'hydrogel.

### 2.2.1.3.2 Polymères d'origine synthétique

Contrairement aux hydrogels naturels, les hydrogels synthétiques ne possèdent pas de propriétés biologiques intrinsèques, mais il est possible de concevoir des hydrogels aux propriétés physico-chimiques et biologiques souhaitées. La synthèse des polymères permet d'obtenir des molécules qui sont reproductibles et ainsi produire un hydrogel

homogène. En 1960, Wichterle et Lim ont synthétisé le premier hydrogel artificiel pour l'application en biologie, le poly(2-hydroxyethyl méthacrylate) ou HEMA [23], matériau qui a été largement utilisé dans la fabrication de lentilles de contact et d'outils pour la libération contrôlée de médicaments. Depuis, de nombreux hydrogels synthétiques non-toxiques, tels que le polyéthylène glycol (PEG) ou l'alcool polyvinylique (PVA), et possédant une bio-dégradabilité nécessaire à l'activité biologique ont été utilisés en ingénierie tissulaire. Ces polymères peuvent aussi être fonctionnalisés pour améliorer leur bio-fonctionnalité [22].

L'hydrogel de PEG est le plus largement utilisé pour ses propriétés intrinsèques car il adsorbe faiblement les protéines et est facile à fonctionnaliser grâce à la présence de deux groupements hydroxyles réactifs. La polymérisation du PEG est de nature covalente et la méthode la plus utilisée est la photopolymérisation, créant ainsi un hydrogel relativement stable ayant des propriétés physico-chimiques modulables telles que la perméabilité, l'élasticité, la rigidité ou la vitesse de dégradation [24].

#### 2.2.1.4 Propriétés physico-chimiques de l'hydrogel

L'utilisation de l'hydrogel, physique ou chimique, comme un biomatériau en vue d'applications biotechnologiques nécessite des propriétés physico-chimiques spécifiques qui doivent pouvoir être contrôlées, telles que par exemple la bio-dégradabilité, la bio-compatibilité [25], la perméabilité, les propriétés chimiques de surface [18] ou les propriétés mécaniques comme l'élasticité [26]. Le contrôle de la dégradation d'un biomatériau est essentiel en ingénierie tissulaire par exemple, car l'hydrogel sert souvent d'échafaudage pour la prolifération et la croissance d'un nouveau tissu. La dégradation d'un matériau peut aussi permettre la libération de molécules actives. Les enzymes intrinsèquement présentes sont souvent utilisées pour la dégradation des hydrogels [25].

Un hydrogel étant formé par un réseau de chaînes de polymère, par leur structure, les hydrogels sont poreux et possèdent donc une perméabilité permettant la diffusion de solutés. Cette caractéristique permet de nombreuses applications nécessitant la diffusion de solutés vers l'intérieur ou l'extérieur de l'hydrogel. Des sondes moléculaires de différentes tailles telles que des molécules de dextran couplées à de la fluorescéine sont utilisées pour caractériser la porosité d'un gel afin de pouvoir contrôler la diffusion des solutés [18]. De cette façon, il est possible de sélectionner un hydrogel ayant une porosité adaptée à l'étude menée. Par exemple, si l'on veut établir un bioréacteur destiné à la culture de bactéries, il faudra que la taille des pores soit suffisamment grande pour laisser passer les molécules d'intérêt mais ne dépasse pas la taille du micro-organisme étudié afin d'en éviter sa fuite. L'hydrogel d'alginate utilisé pour l'encapsulation de cellules [27, 28, 29] par exemple, possède des pores d'un diamètre

de l'ordre de 20 nm [30] : ce qui empêche la diffusion en dehors de la capsule des cellules d'une taille d'environ 15  $\mu\text{m}$ , tout en autorisant le transport des nutriments nécessaires au développement d'un organoïde tels que les acides aminés qui mesurent environ 1 nm. Il est d'ailleurs possible de moduler la taille de la maille de l'hydrogel en changeant le degré de réticulation de ce dernier. De plus, la diffusion d'un soluté, même s'il est d'une taille inférieure à la taille des pores, peut être gênée par les propriétés chimiques du réseau. Ce serait le cas, par exemple, dans un hydrogel de polyélectrolytes où une molécule ayant la même charge que le polymère subira une répulsion électrostatique alors que si la molécule est de charge opposée elle subira une attraction et risque de s'adsorber sur l'hydrogel.

Il existe une large gamme d'hydrogels à différentes propriétés mécaniques, ce qui permet l'utilisation de ce matériau pour diverses applications. Le module d'élasticité ou module d'Young est utilisé pour caractériser les propriétés mécaniques d'un matériau : plus il sera élevé, plus le matériau sera rigide. La rigidité d'un polymère réticulé résulte de la densité de réticulation et de l'énergie des jonctions. La densité de réticulation d'un gel peut être augmentée en accroissant la quantité d'agent réticulant ou la concentration de polymère, et diminuée par le gonflement du réseau. Par ailleurs, les conditions de formation de l'hydrogel telles que le temps de réaction, la température, ainsi que la quantité et le type de solvant ont une influence sur la structure finale du gel et peuvent par conséquent également affecter les propriétés mécaniques du gel [26].

### 2.2.2 Méthodes de fabrication

De nombreuses méthodes de fabrication de tubes en hydrogel à l'échelle micrométrique ou millimétrique ont été rapportées dans la littérature. Ces méthodes diffèrent essentiellement selon le mode de réticulation du polymère et l'application considérée. Dans le cas de la culture de cellules et tissus humains dans une matrice tridimensionnelle, les cellules sont le plus souvent incluses dans l'hydrogel, ce qui permet la formation d'un tissu ayant une architecture déterminée. Les méthodes employées doivent donc être douces afin de ne pas causer un stress trop important ou la mort cellulaire. Ainsi, souvent les hydrogels physiques seront privilégiés car ils ne nécessitent pas l'utilisation d'initiateurs ou autres agents réticulant qui pourraient potentiellement être toxiques.

En portant un intérêt particulier aux approches permettant une gélification rapide, quelques méthodes de fabrication de tubes d'hydrogel parmi les nombreuses qui existent sont présentées en figure 2.2.1). Une méthode intéressante et innovante pour la production de tubes d'hydrogel repose sur l'enroulement spontané d'un hydrogel

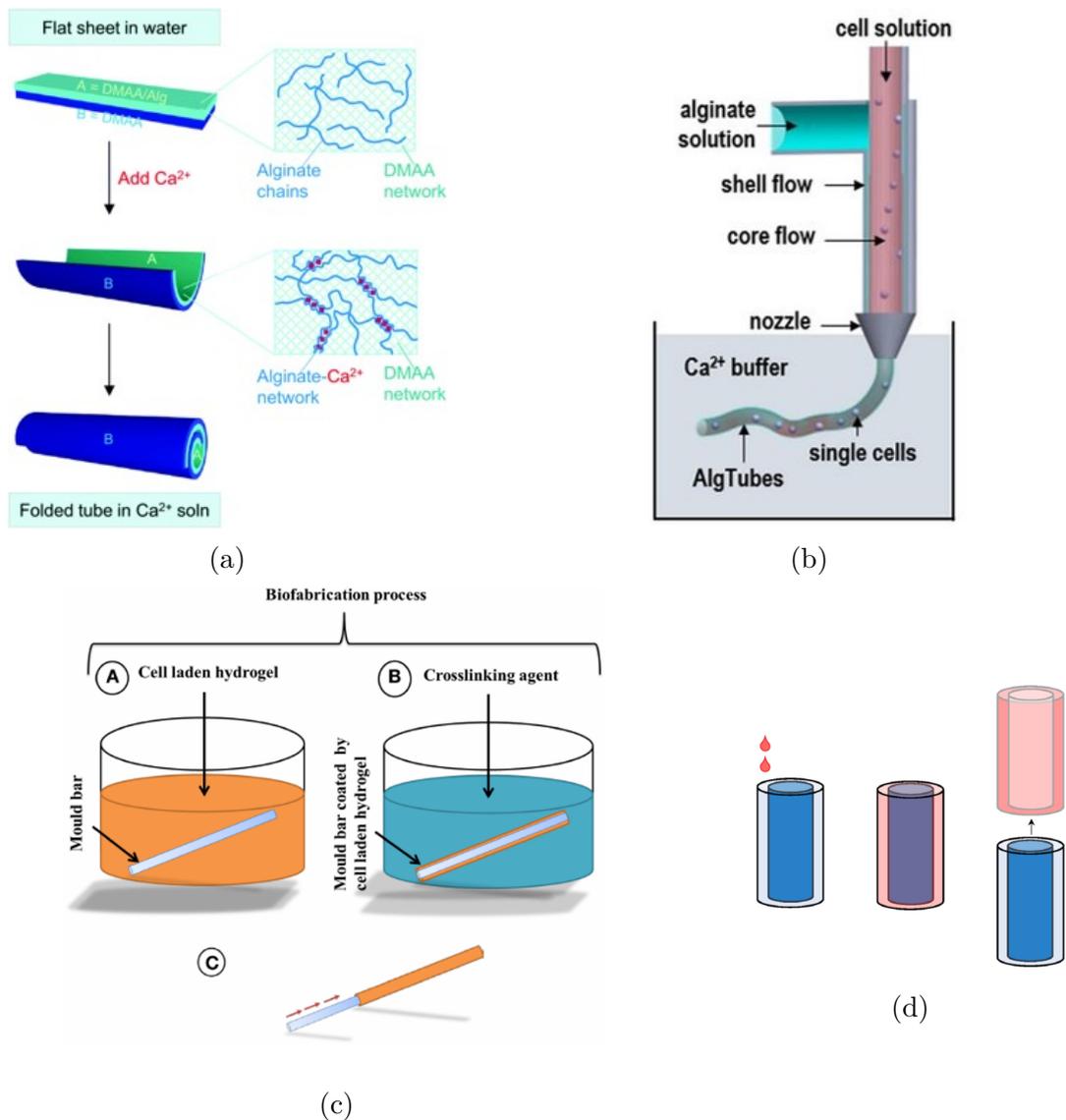


FIGURE 2.2.1 – Différentes méthodes de fabrication de tubes d'hydrogel d'alginate : (a) par enroulement spontané d'un feuillet d'hydrogel à l'ajout d'ions calcium [31], (b) par extrusion d'une fibre à travers un injecteur dans un bain gélifiant [32], (c) par trempage d'un moule sous la forme d'une barre cylindrique dans la solution de polymère puis dans la solution d'agent gélifiant [33] et (d) par coulage d'une solution dans un moule [34]

composé d'une première couche "passive" de N,N'-diméthylacrylamide (DMAA) réticulé et une deuxième couche "active" de DMAA réticulé contenant aussi des chaînes d'alginate (figure 2.2.1a). Lorsqu'un cation divalent tel que le calcium est introduit, la bi-couche s'enroule grâce à la rigidification de la couche active, causée par la gélification de l'alginate par les cations [31]. L'hydrogel ainsi formé possède une forme tubulaire mais il n'est pas soudé.

Il existe aussi de nombreuses méthodes de formation de tubes d'hydrogel ensemencés de cellules telle que l'extrusion coaxiale d'une solution de polymère en phase externe et d'une solution contenant un agent gélifiant en phase interne (figure 2.2.1b). Cette technique aussi appelée bio-impression dans la littérature, a été employée pour la fabrication de structures vasculaires creuses et pouvant être perfusées [35, 36] mais aussi comme méthode de fabrication de bioréacteur fermé dans le cadre de la recherche sur les cellules souches [32]. En trempant un cylindre plein, servant de moule et fixant ainsi le diamètre interne du tube, d'abord dans une solution visqueuse de polymère puis dans une solution contenant un agent gélifiant (figure 2.2.1c), Ghanizadeh Tabriz et collaborateurs montrent qu'il est aussi possible de fabriquer des tubes d'hydrogel ayant un diamètre variant entre 0,6 mm et 6 mm [33]. Enfin, une méthode permettant en particulier la production de tubes mesurant plusieurs millimètres de diamètre est le moulage en coulant une solution de polymère dans une empreinte (figure 2.2.1d) qui a été utilisée pour fabriquer, entre autres, un modèle de vaisseaux sanguins *in vitro* [37].

## 2.3 Un outil pour étudier l'évolution bactérienne

L'élaboration d'un tube d'hydrogel sans cellules mammifères permettant un transport convectif et une diffusion radiale grâce à la membrane semi-perméable permet de modéliser de façon simplifiée l'épithélium intestinal. Ajouter la possibilité de mettre en place un gradient de concentration chimique le long du tube reproduit les variations de conditions chimiques des micro-habitats le long du tube digestif. Cultiver des bactéries dans un bioréacteur possédant ces propriétés permet l'étude de l'adaptabilité des micro-organismes aux conditions environnementales.

### 2.3.1 Notion d'évolution dirigée

La sélection naturelle est le mécanisme décrit comme étant à l'origine de la diversification du vivant et selon lequel les organismes qui sont capables de s'adapter à une pression environnementale survivent. Ces stress peuvent être, entre autres, un manque de nourriture, la présence de molécules toxiques ou même une température trop extrême auxquels les organismes s'adaptent parfois grâce des mutations épigénétiques, leur conférant un nouveau phénotype, ou caractéristique. Ces mutations peuvent être réversibles si les organismes ne sont plus stimulés, mais ils sont surtout transmissibles à leur descendance permettant l'évolution de l'espèce [38].

L'étude en laboratoire de l'évolution appliquée aux bactéries est particulièrement intéressante car ces communautés de microbes, en plus d'être capables de se proliférer

rapidement, comptent pour la majorité des organismes vivants sur Terre et des indices suggèrent qu'ils existent depuis environ 3,5 milliards d'années [39]. Nous savons aujourd'hui qu'il existe de nombreuses bactéries ayant des aptitudes bénéfiques impliquées dans les cycles bio-géochimiques (cycle du carbone, de l'azote, de l'oxygène...) ou dans l'assainissement des environnements pollués. Ces communautés de micro-organismes jouent aussi un immense rôle dans le maintien de notre santé, rendant important une meilleure compréhension de leur évolution afin d'en exploiter les bénéfices pour des applications écologiques, industrielles et sanitaires.

En laboratoire, une expérience d'évolution dirigée consiste une en succession de propagations de micro-organismes dans un bioréacteur : dans un premier temps les bactéries subissent une phase de croissance puis elles subissent une phase de dilution correspondant à un rafraîchissement du milieu de culture (apport de nutriments) pour leur permettre de continuer à croître. Ainsi, au fil des générations de micro-organismes, la population acquerra des mutations permettant aux bactéries de s'adapter à leur environnement.

Parmi les différentes méthodes de culture en continu pour l'étude de l'évolution, nous pouvons citer le chémostat et le morbidostat qui fonctionnent sur un principe similaire. Le chémostat dont le fonctionnement est expliqué en partie 2.3.1.1 favorise la croissance des bactéries poussant le plus rapidement car elles ont acquis une capacité leur permettant par exemple de mieux utiliser le substrat limitant. Dans la nature, cette stratégie qui permet à un organisme de coloniser rapidement une niche est observée chez certaines bactéries comme *Escherichia coli*, chez les levures mais aussi chez les cellules cancéreuses [40].

Le chémostat permettant de maintenir des conditions de croissance fixe, l'adaptation des microbes à une concentration faible et limitante de nutriments peut être étudiée. Le morbidostat, un chémostat où une toxine est ajoutée dans le milieu de culture, permet l'étude de l'adaptation d'une population de bactérie face à un milieu hostile, en présence d'une concentration croissante d'antibiotiques par exemple.

### 2.3.1.1 Définition d'un bioréacteur

Un bioréacteur désigne un réservoir dans lequel des cellules, animales ou de micro-organismes, peuvent être cultivés de façon contrôlée. À l'échelle industrielle, ils sont utilisés pour créer des produits de fermentation : de la biomasse, des métabolites primaire ou secondaires, ou des produits modifiés par la bio-transformation. Les champs d'applications de la bio-production incluent les industries chimique, pharmaceutique, agroalimentaire et énergétique [41].

Il existe plusieurs modes de fonctionnement des bioréacteurs selon leur application

qui sont définis par la façon dont les nutriments sont apportés. En mode "batch", le bioréacteur n'est pas alimenté entre le début et la fin de la fermentation déplaçant le milieu en nutriments et engendrant une accumulation de toxines. Dans ce système fermé, la composition du milieu de culture change constamment, rendant impossible l'établissement d'un état stationnaire. Les limites de ce mode peuvent être contournées par la mise en place d'un bioréacteur ouvert et continu permettant l'apport de milieu frais dans le réservoir et l'élimination des cellules excédentaires par un effluent. Il existe deux types de bioréacteurs continus : le biostat ou turbidostat et le chimostat. Dans un turbidostat, la turbidité qui reflète la densité cellulaire détermine la façon dont le réservoir est alimenté en substrats; alors que dans le cas d'un chimostat, l'environnement chimique (source de carbone, azote, phosphore...) sont maintenues constantes ce qui produit une densité cellulaire constante. Le taux de dilution est donc un paramètre important pour la création d'un état stationnaire qui peut être brisé par un taux de dilution "maximal" où toutes les cellules sont évacuées du réservoir car elles n'ont pas eu le temps de se répliquer.

Lors de la conception d'un bioréacteur continu, quelle que soit l'échelle, certains paramètres doivent être contrôlés pour une performance optimale [41] :

- la concentration de la biomasse doit être suffisamment élevée
- la stérilité doit être maintenue pour une culture pure
- une agitation efficace est nécessaire pour une distribution uniforme des substrats et microbes
- le cisaillement doit être adapté car un fort cisaillement peut être néfaste pour les micro-organismes et rompre la paroi cellulaire, alors qu'à l'inverse, un faible cisaillement peut causer une agrégation indésirable des cellules et même une croissance des bactéries sur les parois du bioréacteur ou sur l'agitateur.
- l'apport en nutriment doit être suffisant afin de maintenir une croissance constante
- l'évacuation des produits d'intérêt et les déchets toxiques du métabolisme permet une prolifération efficace
- une aération homogène permet de maintenir le niveau d'oxygène dissous constant, favorisant une croissance homogène

### 2.3.2 Culture dans un bioréacteur à compartiment fermé

La culture de micro-organismes ou d'organoïdes à base de cellules de mammifère dans un compartiment fermé et subissant uniquement des échanges diffusifs avec le milieu externe a été étudié. L'encapsulation en est un exemple, cette méthode confère

notamment une protection mécanique aux objets encapsulés, facilitant leur manipulation. De nombreux travaux d'encapsulation ont été menés au LCMD où nous pouvons citer entre autres les travaux de thèse de Bettina Roellinger, Edouard Duliège et Wafa Bouhleb [42, 43, 27] qui ont encapsulé selon différentes méthodes des bactéries, des micro-algues et des cellules épithéliales et endothéliales humaines. Il existe certaines limites à de tels bioréacteurs qui sont : un espace de croissance restreint et une impossibilité d'accès aux objets encapsulés. Il est ainsi intéressant de concevoir des bioréacteurs tubulaires permettant une interaction avec leur milieu interne.

### 2.3.3 Un bioréacteur ouvert en flux

La circulation d'un fluide dans un conduit dont le volume n'est limité qu'à la section et la longueur du tube et qui peut être obstrué de part et d'autre, trouve aussi son application dans la biologie pour la production d'algues par exemple (figure 2.3.1). Une telle structure tubulaire permettrait de minimiser les contaminations extérieures et l'évaporation de l'eau. Il existe cependant des limites dues à la géométrie qui sont : l'établissement, le long du tube, d'un gradient chimique de pH, oxygène ( $O_2$ ) dissous ou de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) dissous [44]. Un système de production de produits ou sous-produits biologiques est appelé un bioréacteur.



FIGURE 2.3.1 – Photo-bioréacteur tubulaire pour la production d'algues [44]

Il existe de nombreux bioréacteurs tubulaires, ou à canaux, ayant une dimension microscopique employés en biologie cellulaire mais aussi en microbiologie pour la culture sous flux. Contrairement aux bioréacteurs industriels, ces outils servent majoritairement à l'étude de phénomènes biologiques. De nombreux organes ont ainsi été reproduits grâce à l'utilisation de la microfluidique. Par exemple, des faisceaux de membranes en forme de fibres creuses de dimensions micrométriques et placés en croix

servant à mimer la circulation artérielle et veineuse ont permis la tri-culture d'hépatocytes, de cellules endothéliales sinusoidales et de cellules stellaires [45]. Nous pouvons aussi citer les divers systèmes d'organe-sur-puce qui modélisent la perturbation de la barrière hémato-encéphalique [46], qui modélisent l'influence de l'asthme induit par un virus sur les poumons [47] ou encore qui étudient la toxicité de médicaments sur le foie [48]. Tous ces microsystèmes ont la particularité d'avoir deux compartiments, permettant ainsi une vascularisation de la couche cellulaire. Kim et al, ont proposé un système encore plus complexe grâce à la présence de chambres à vide dans leur puce, permettant d'implémenter un mouvement péristaltique, aidant fortement la différenciation cellulaire d'un épithélium intestinal [6].

Le biofilm est un amas de bactéries pouvant être de la même espèce ou d'espèces différentes vivant dans une matrice qui protège les micro-organismes de l'environnement, créant ainsi des communautés résistantes aux antibiotiques. Ils occupent la majorité des surfaces humides sur Terre, ce qui suscite l'intérêt de la recherche scientifique, en particulier par rapport au phénomène d'encrassement biologique ou biofouling qui survient, entre autres, sur les dispositifs médicaux ou les canalisations. La culture de bactéries sous forme de biofilms en flux a majoritairement été observée dans des chambres à flux ou des capillaires, permettant de mieux comprendre la dynamique de croissance d'un biofilm. Lorsque le milieu de culture est pauvre en nutriments, les bactéries ont tendance à s'agréger et former un biofilm qui est plus dense en présence d'un flux turbulent [49, 50, 51] dont la densité de bactéries présentes en surface est plus élevée que dans les couches internes du biofilm [52]. Par la culture de bactéries dans des tubes de PTFE, Karande et al. proposent une méthode par flux segmenté d'air et d'eau pour contrôler la croissance du biofilm [53].

## 2.4 Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse est la conception d'un bioréacteur tubulaire imitant les fonctions de transports des organes tubulaires. Ce système est une première étape vers la formation d'un modèle d'organe artificiel mettant en présence un épithélium et un microbiote. Le choix du matériau s'est porté sur un hydrogel, l'alginate, qui permet la formation d'un gel ayant comme propriétés la bio-compatibilité, la transparence et une semi-perméabilité permettant la diffusion de petites molécules. Cette dernière propriété couplée à la création d'un gradient de concentration d'un soluté à l'extérieur du tube est à l'origine de l'établissement d'un chémostat dans le tube d'hydrogel. La culture sur un temps assez long de bactéries dans un outil permettra ainsi l'étude de l'adaptabilité de bactéries.



# Chapitre 3

## Procédé d'extrusion de tubes d'hydrogel

### 3.1 Introduction

Nous avons vu dans l'état de l'art qu'il existe de nombreuses méthodes permettant la mise en place de bioréacteurs tubulaires. Dans ce premier chapitre expérimental, nous proposons la formation d'un tube d'alginate à l'échelle millimétrique par un procédé de co-extrusion à faible débit. Ce procédé original dépend de nombreux paramètres tels que la hauteur et le débit d'extrusion ou la concentration en agent réticulant dans le bain ou la phase interne de co-extrusion. Nous sommes ainsi capables former des tubes qui peuvent être facilement manipulés à la main dont il est possible de moduler l'aspect de la paroi interne mais aussi le diamètre interne et externe.

### 3.2 Matériel et Méthode

#### 3.2.1 L'alginate

L'alginate est un polysaccharide, extrait de l'algue brune qui a déjà été beaucoup étudié pour des applications biologiques. Sous forme d'hydrogel, le polymère présente de nombreux avantages, tels que sa biocompatibilité, sa semi-perméabilité et sa transparence, qui font de lui un matériau idéal pour l'élaboration de bioréacteurs. L'alginate est un bio biopolymère, ce qui fait que la distribution en taille des chaînes est assez large, et donc souvent les grandeurs ne peuvent qu'être données en termes de moyennes. La masse molaire des alginates dépend notamment de l'algue dont est extrait l'alginate, de l'âge de l'algue et de la partie de l'algue utilisée. Cette masse molaire est

importante car elle va avoir un effet sur le comportement rhéologique mais également sur les propriétés physico-chimiques de ce polymère.

L'alginate est un copolymère à bloc composé de deux monomères différents : le  $\beta$ -D-mannuronate (M) et le  $\alpha$ -L-guluronate (G). Ces deux acides ont la même formule brute mais ont une conformation spatiale différente : le groupement carboxyle est soit en position équatoriale (M) soit en position axiale (G). L'enchaînement des monomères varie suivant le type d'alginate et est décrit ainsi : blocs G (-G-G-), bloc M (-M-M-) ou blocs MG (-M-G-) (figure 3.2.1). La conformation des blocs G permet la formation d'une structure pouvant emprisonner des cations divalents entre deux blocs G. Ainsi, le ratio des différents monomères, noté ratio M/G, est un paramètre important dans la gélification de l'hydrogel et diffère selon l'espèce d'algue dont est extrait l'alginate.

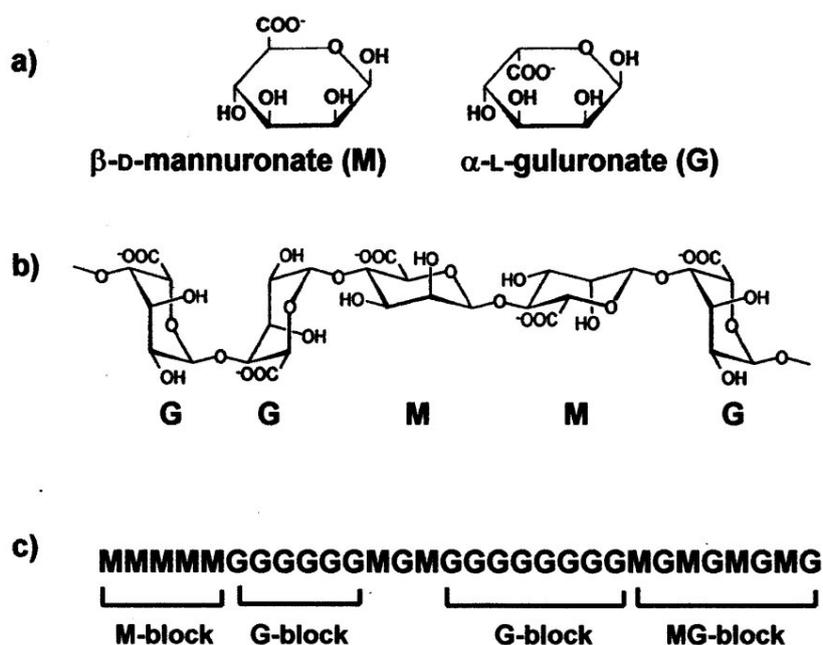


FIGURE 3.2.1 – Structure et composition du copolymère d'alginate : (a) monomères constituant l'alginate, (b) exemple de conformation d'une chaîne, et (c) exemple de distribution des blocs M, G et MG [54]

### 3.2.1.1 La transition sol-gel

La transition sol-gel se fait lorsque les cations monovalents de sodium sont substitués par des cations ions divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ . Deux blocs G de deux chaînes différentes peuvent être réticulés par un cation divalent via une interaction électrostatique de complexation entre deux groupes carboxyliques du polysaccharide. Le réseau rigide en trois dimensions ainsi créé est décrit par une structure

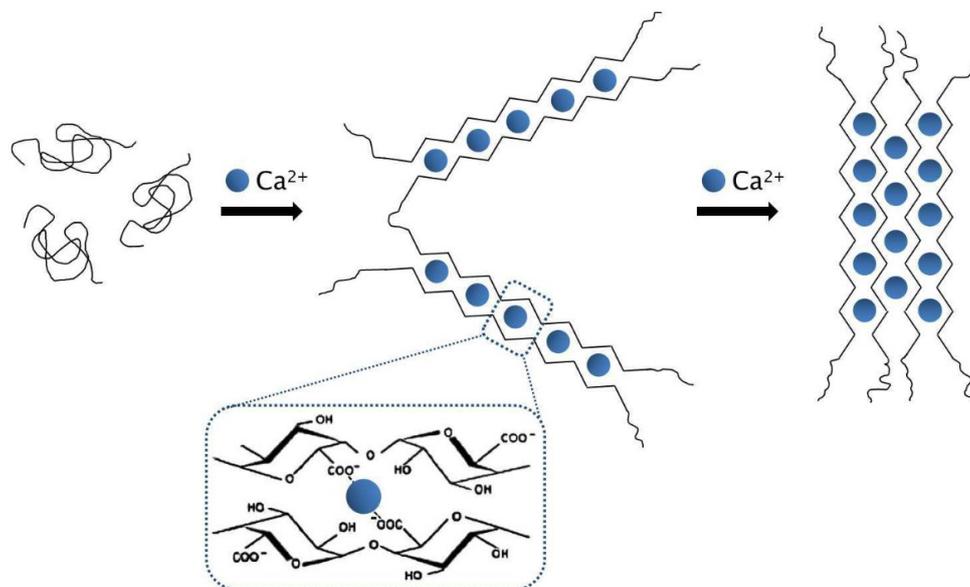


FIGURE 3.2.2 – Gélification de l'alginate par l'ion calcium selon la structure de "boîte d'œufs" [55]

en "boîte d'œufs" (figure 3.2.2) qui est à l'origine du gel. Les autres dimères peuvent aussi interagir mais les interactions sont moins fortes. Cet hydrogel physique est réticulé par des liaisons faibles à distance telles que les liaisons ionique ou électrostatique, il est donc possible de le resolubiliser par exemple par l'ajout d'un ion capable de former un complexe plus énergétiquement favorable que celui formé par l'alginate et le cation divalent, un exemple étant le citrate de sodium qui est un chélatant du calcium.

Dès que l'alginate entre en contact avec la solution de cations divalents, une membrane solide se forme instantanément à l'interface. La gélification complète de l'hydrogel s'accompagne d'une contraction. Ce phénomène, appelé synérèse, résulte de l'expulsion de l'eau causée par la dimérisation des chaînes de polymère. La concentration de la solution d'alginate (figure 3.2.3a) et en cations divalents (3.2.3b) exerceront donc une forte influence sur la progression de la synérèse [56] puisqu'elle est causée par le pontage des chaînes d'alginate. En effet, dans ses travaux de thèse, Julie Godefroid a montré que le front de gélification, suivant un modèle de diffusion-réaction, avance plus rapidement lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est plus élevée [57]. Les travaux de Ouwerx et collaborateurs montrent également que le module d'Young de billes d'alginate atteint un plateau pour des concentrations en  $\text{CaCl}_2$  supérieures à 75 mM, équivalentes à  $[\text{Ca}^{2+}] = 1/2 [\text{COO}^-]$  (figure 3.2.3b, données sans NaCl indiqués par des carrés) [58]. Par ailleurs, la cinétique de gélification et la contraction du gel dépendent aussi de la masse moléculaire [59], de la structure chimique (ratio M/G) des chaînes

d'alginate, et du cation employé (figure 3.2.3c) [58].

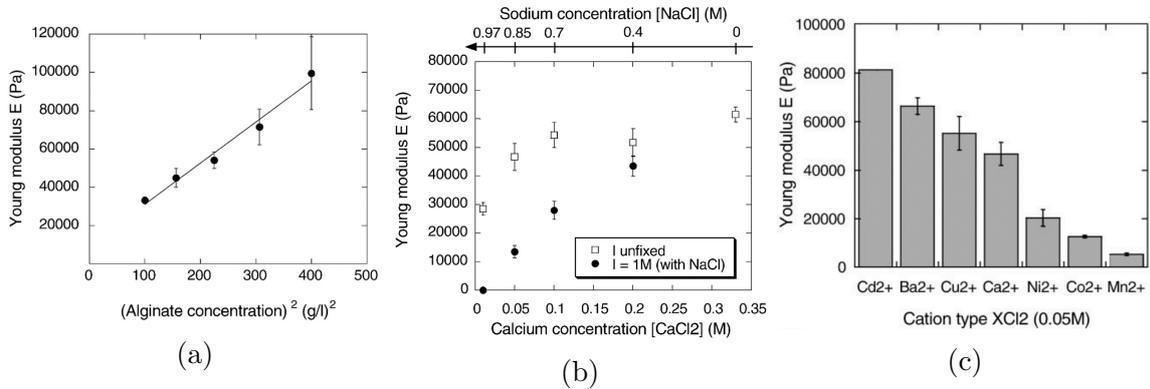


FIGURE 3.2.3 – Module élastique de l'hydrogel d'alginate en fonction (a) de la concentration en alginate, (b) de la concentration en calcium et (c) du type d'ion divalent utilisé [58].

### 3.2.1.2 Préparation des solutions

Dans cette thèse, le polymère utilisé est l'alginate de sodium PROTANAL® LF 200 FTS, de grade pharmaceutique, qui nous a été fournie par FMC Biopolymer. Par des mesures de diffusion statique de la lumière à différents angles, Leslie Rolland a pu déterminer la masse molaire moyenne de ce polymère :  $M_w = 150.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  [30], et le ratio M/G de cette référence donnée par le fournisseur est d'environ 42 %. La poudre d'alginate de sodium est solubilisée à une concentration de 1,6 % m/m dans de l'eau ultra-pure. L'alginate étant un poly-électrolyte naturel, la solution doit subir des étapes de purification afin d'en retirer les impuretés :

- La solution est centrifugée à vitesse maximale dans des tubes de 50 ml afin d'en retirer les impuretés insolubles
- Le surnageant est filtré à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 5  $\mu\text{m}$  dans des tubes de centrifugation de 50 ml
- Les tubes sont stérilisés par pasteurisation à l'étuve (65°C) pendant une heure

La solution ainsi obtenue possède une viscosité à taux de cisaillement nul de 0,88 Pa.s qui est 10 % plus faible qu'en absence de traitement thermique de la solution (figure 3.2.4), suggérant que la masse moléculaire moyenne est abaissée par la pasteurisation.

Dans ce chapitre, le cation utilisé sera l'ion calcium provenant de la solubilisation du chlorure de calcium. Le coefficient de diffusion  $D$  des ions calcium dans l'alginate à 2 % wt est de  $7.10^{-4} \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$  [60]. Si l'on considère un modèle uniquement diffusif,

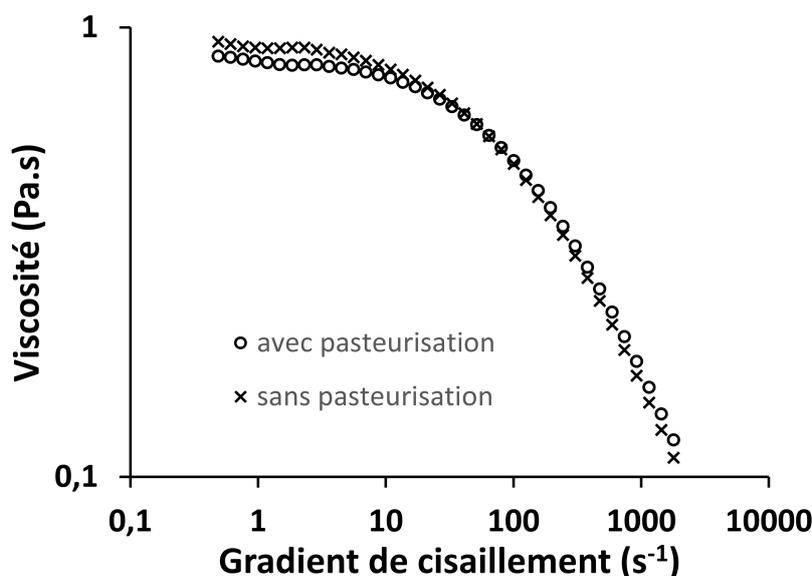


FIGURE 3.2.4 – Courbes d’écoulement de solutions d’alginate LF200FTS à 1,6 % m/m préparées avec ou sans traitement thermique

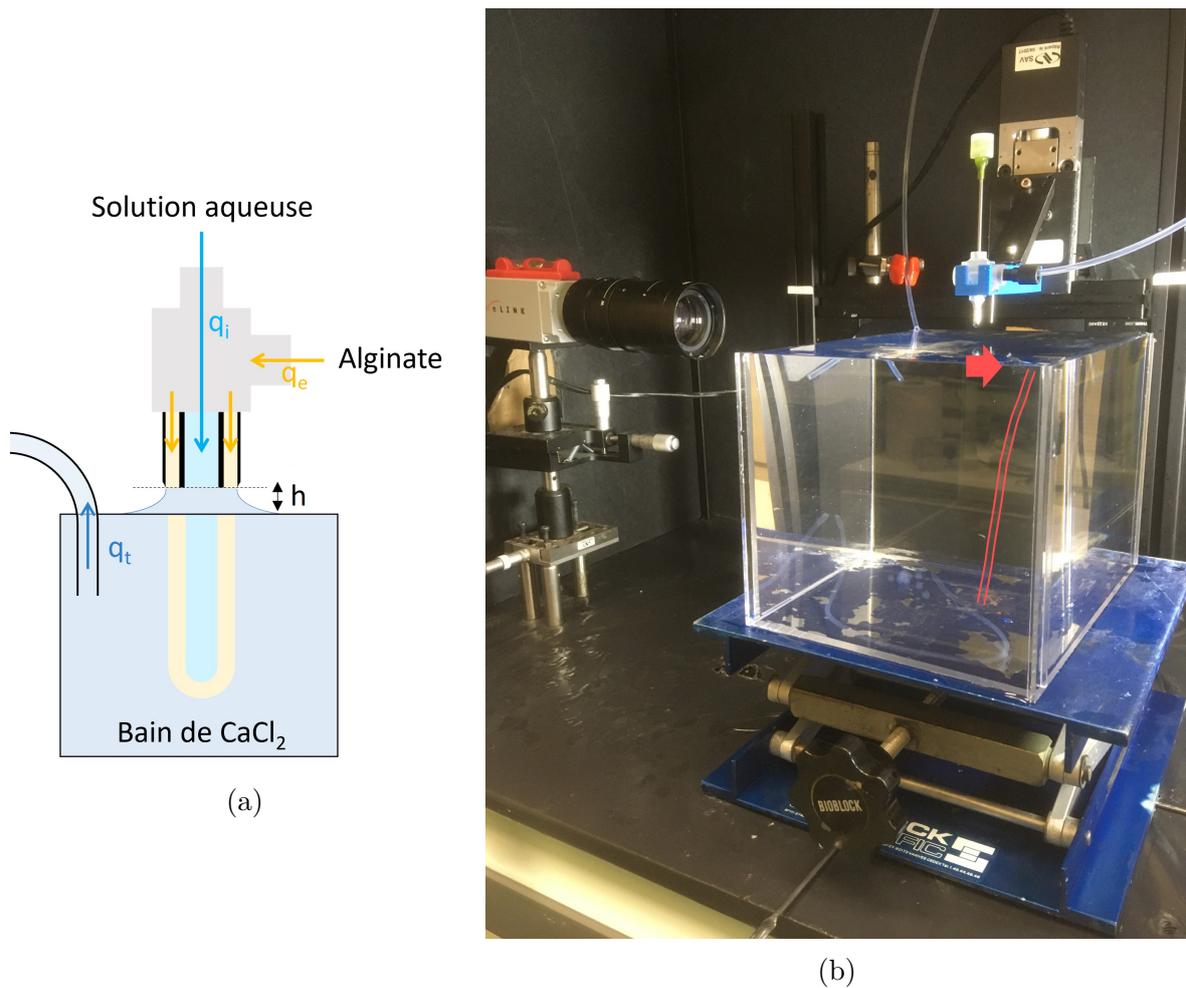
le temps  $t$  de diffusion du cation à travers une épaisseur d’alginate  $l$  peut donc être évalué ainsi :

$$t \sim \frac{l^2}{D}$$

En considérant une épaisseur moyenne de membrane de  $l = 0,6$  mm, le temps de diffusion des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans l’alginate est de presque 8 minutes.

### 3.2.2 Dispositif expérimental

Le dispositif final de fabrication de tubes d’alginate est représenté en figure 3.2.5a. Il est composé d’un injecteur à deux voies, fabriqué en résine type ABS par stéréolithographie, dans lequel sont insérés deux tubes d’acier concentriques. Les différentes solutions sont injectées à l’aide de pousse seringue à travers des tubes de diamètre interne de 2,5 mm. De l’alginate à 1,6 % m/m est extrudée à un débit  $q_e$  par le tube externe qui est composé de la partie métallique d’un punch à biopsie de 3 mm (KAI Medical) ayant un diamètre interne de 3 mm et un diamètre externe de 3,06 mm. Après plusieurs essais avec d’autres cylindres de divers matériaux (figure 3.2.5c), nous avons décidé d’utiliser le punch à biopsie pour le tube externe car l’embout chanfreiné permet une localisation de la ligne triple en sortie de buse proche de la paroi interne du tube externe. Dans le cas de l’extrusion d’une fibre pleine d’alginate, le tube interne sera relevé et bouché afin de n’avoir qu’une seule injection de fluide. Dans le cas d’une co-extrusion, le tube interne est une aiguille (Nordson) de diamètre interne 1,54 mm



	(1)	(2)	(3)	(4)
<b>Matériau</b>	Polypropylène	Tubes interne et externe en acier	Tube externe en résine type ABS, tube interne aiguille en acier	tube externe en biopsy punch chanfreiné, tube interne aiguille en acier
<b>Diamètres internes</b>	-	Externe: 1,45   Interne: 1	Externe: 1,83   Interne: 1,54	Externe: 1,83   Interne: 1,54
<b>Diamètres externes</b>	Externe: 4   Interne: 2,5	Externe: 3,45   Interne: 3,3	Externe: 3,5   Interne: 3,3	Externe: 3,06   Interne: 3

(c)

FIGURE 3.2.5 – (a) Schéma du dispositif de fabrication de tubes d'alginate, (b) photographie du dispositif expérimental où un tube d'alginate délimité par un trait rouge et indiqué par la flèche rouge est en cours de gélification et (c) tableau récapitulatif des différents injecteurs qui ont été utilisés présentant leurs dimensions en millimètres et le matériau des tubes composant la buse.

et de diamètre externe 1,83 mm et dont l'extrémité se situe à la même hauteur que le tube externe. Une solution aqueuse avec ou sans calcium est extrudée à un débit  $q_i$  depuis cette voie interne. Dans le cas d'une solution contenant du calcium, un protocole de rinçage du système a été mis en place afin de prévenir l'obstruction de l'injecteur par la réticulation de l'alginate à l'intérieur de l'injecteur.

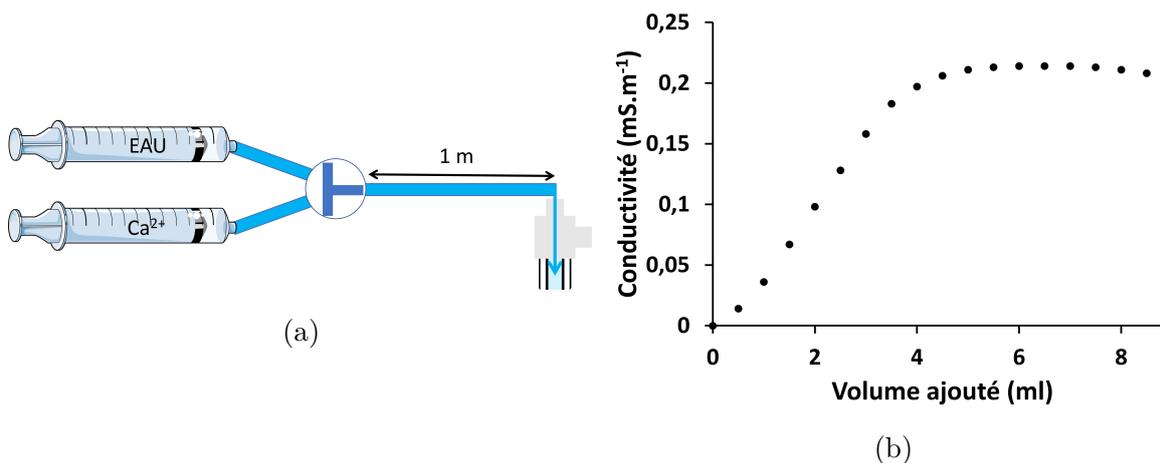


FIGURE 3.2.6 – (a) Schéma de l'injection en parallèle pour le rinçage du système et (b) détermination expérimentale du volume de solution contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par mesure de conductivité.

Ce système de rinçage est un circuit parallèle au circuit principal relié par une vanne. Ainsi nous pouvons injecter séquentiellement de la solution de calcium ou de l'eau (figure 3.2.6a). Le temps nécessaire à l'évacuation complète du calcium résidant dans le système d'injection est évalué par une mesure de conductivité. Le tube d'injection est d'abord rempli de la solution de calcium puis la vanne est tournée afin d'injecter de l'eau. La conductivité est mesurée dans un bocal d'eau, sous agitation, dans lequel le contenu du tube est injecté (figure 3.2.6b). Le tube mesurant 1 m de long, il devrait y avoir un volume d'environ 5 ml de solution de calcium à expulser. À un débit de  $100 \text{ ml.h}^{-1}$ , nous observons qu'un plateau est atteint après un rinçage de 5 ml. Nous cherchons le volume où le fluide extrudé par la buse sera de l'eau pure, ce qui diluera le mélange et diminuera donc la valeur de conductivité. Ce volume est de 8 ml, soit à peu près 5 minutes.

L'injecteur est placé à une hauteur  $h$  de la surface libre du bain. Cette hauteur peut être modulée à l'aide d'une platine motorisée (Connex-MFA-CC, Newport), dont la vitesse de déplacement peut être modulée, pilotée par un ordinateur. Le bain, contenu dans une cuve rectangulaire et transparente en acrylique, est composé de chlorure de calcium (anhydre, pureté  $\geq 93 \%$ , Sigma-Aldrich) solubilisé à une concentration de

100 mM. Le bain de calcium est rempli jusqu'au bord de la cuve. Un tube permet d'aspirer la solution de calcium afin de maintenir le niveau du bain constant. Le débit d'aspiration est le même que le débit total d'extrusion  $q_{total} = q_e + q_i$ . Les tubes d'alginate ainsi formés sont pendus sur le bord de la cuve et laissés pendant 15 minutes à la verticale dans le bain afin d'éviter de les manipuler avant la réticulation complète de l'hydrogel.

### 3.2.3 Premières observations

Dans un premier temps, nous cherchons à mettre en place un mécanisme de fabrication de tubes d'hydrogel d'alginate par co-extrusion. Dans cette expérience préliminaire, la solution aqueuse de fluide interne est composée uniquement d'eau ultra-pure.

#### 3.2.3.1 Régime de jet liquide impossible

Il existe de nombreuses méthodes de fabrication de fibres de polymère référencées dans la littérature, une méthode qui est particulièrement en lien avec la fabrication de fibres à base d'alginate est le wet spinning ou sa version modifiée le dry-jet spinning [61]. Dans le cas du wet spinning, la buse est directement immergée dans le bain. L'extrusion produit alors un jet qui est guidé dans un système afin d'enrouler la fibre. Le dry-jet spinning repose sur le même principe d'enroulement mais dans ce cas, le jet est produit dans l'air avant d'être immergé, permettant d'éviter le contact entre un bain potentiellement réticulant et la buse. Les tubes d'alginate que nous produisons sont trop mous pour pouvoir être enroulés, mais nous pouvons nous inspirer de ces techniques afin de créer un contact entre la buse et le bain.

Des fibres d'hydrogel, pleines ou creuses, peuvent ainsi être formés par la création d'un jet liquide dans l'air qui entre dans un bain gélifiant. Une méthode pour créer un tel cylindre est l'extrusion de liquide à partir d'une buse en appliquant une pression sur le réservoir contenant le liquide. Cependant, un jet liquide est formé uniquement si l'inertie du liquide dépasse la force de rappel de la tension de surface qui tend à minimiser l'aire. La transition du régime de goutte à goutte au régime de jet est caractérisée par le nombre de Weber, où  $\rho$  est la masse volumique du fluide utilisé,  $r_j$  est le rayon du jet,  $u_j$  est la vitesse moyenne du flux et  $\gamma$  la tension de surface entre le fluide et la phase continue (ici l'air). Dans le cas d'un fluide non visqueux, la pression dynamique  $\rho u_j^2$  doit être plus grande que la pression capillaire  $\gamma/r_j$  et nous obtenons ainsi le critère approximatif suivant :

$$We = \frac{\rho r_j u_j^2}{\gamma} > 1. \quad (3.2.1)$$

Du point de vue de la stabilité, un jet est formé si le temps de transit à travers une longueur d'onde instable  $\lambda/u_j$  est plus petit que le temps de rupture capillaire  $\tau_c = \sqrt{\rho h_0^3/\gamma}$  [62]. Puisque  $\lambda$  est proportionnel à  $r_j$ , nous obtenons le même critère pour le nombre de Weber, soit  $We > 1$ . Une analyse plus rigoureuse est basée sur la relation de dispersion spatiale obtenue lorsque la perturbation possède la forme suivante :

$$r(z, t) = r_j + \delta_r e^{i(kz - \omega t)}, \quad (3.2.2)$$

où  $r$  est le rayon du jet perturbé par une petite perturbation initiale d'amplitude  $\delta_r$ ,  $k = 2\pi/\lambda$  est le nombre d'ondes et  $\omega = 2\pi f$  et  $f$  sont la pulsation et la fréquence de l'onde de surface respectivement. Les perturbations grandissent dans l'espace et la relation de dispersion spatiale  $k(\omega)$  est obtenue numériquement. Une perturbation grandit à une position fixe, par exemple, pour une stabilité locale, si la vitesse de groupe disparaît, la partie imaginaire de la pulsation est positive,

$$\frac{\partial \omega}{\partial k} = 0 \text{ et } \text{Im}(\omega) > 0. \quad (3.2.3)$$

Ces calculs montrent que l'instabilité absolue survient pour  $We < 3,15$  [63] et un jet est formé lorsque l'instabilité devient connective et donc lorsque  $We > 3,15$ . Les mêmes auteurs ont aussi montré que le nombre de Weber critique diminue lorsque la viscosité diminue [64]. Cependant, pour une faible inertie, la gravité va jouer un rôle majeur qui dépend de la taille de l'injecteur et donc du nombre de Bond défini comme  $Bo = \rho g r^2/\gamma$ , où  $r$  peut être le rayon interne de l'injecteur ( $r_i$ ) ou le rayon externe ( $r_e$ ) selon les conditions de mouillage. L'instabilité absolue prend alors la forme d'un régime de goutte à goutte où une goutte se détache de la buse lorsque sa masse est telle qu'un pont liquide instable est formé entre la goutte et la buse. L'analyse de stabilité d'un jet visqueux où la gravité est prise en compte [65], permet de donner un critère d'existence à un jet liquide englobant les forces d'inertie, visqueuse, gravitationnelle et capillaire. Une formule empirique, basée sur une étude numérique, donnant un nombre de Weber critique  $We_c$ , est déduite [65, 62]

$$We_c = 0,0034 (BoOh)^{-5/16}, \quad (3.2.4)$$

où  $Oh = \nu \sqrt{\rho/r_j \gamma}$  est le nombre d'Ohnesorge et  $\nu$  est la viscosité cinématique.

En considérant que dans nos expériences avec une solution d'alginate le rayon caractéristique de l'injecteur est de 1,5 mm, la tension de surface 72 mN/m, la viscosité dynamique  $\eta = \rho \nu$  0,88 Pa.s et la densité environ 1 kg/m<sup>3</sup>, les nombres de Bond et Ohnesorge correspondants sont respectivement 0,31 et 2,68. Cela implique que le débit

critique  $q = \pi r_j^2 u_j$  déduit du nombre de Weber critique donné par l'équation 3.2.4 est de l'ordre de  $1000 \text{ ml.h}^{-1}$  pour l'extrusion simple d'une solution d'alginate, et sera augmenté dans le cas d'une co-extrusion avec une solution ayant une viscosité plus faible puisque la viscosité effective sera abaissée et le nombre d'Ohnesorge aussi. Ces conditions de débit ne sont pas compatibles avec le dispositif expérimental développé au laboratoire pour la fabrication de tubes d'hydrogel dans un bain gélifiant statique car le tube touchera rapidement le fond du récipient et pliera, induisant des défauts dans la membrane d'hydrogel pendant sa solidification, et des perturbations au niveau de l'extrusion. De plus, cette fibre, si elle est trop longue, s'enroulera sur elle-même. Il nous sera alors difficile de manipuler ces nombreux mètres de tube sans le déformer.

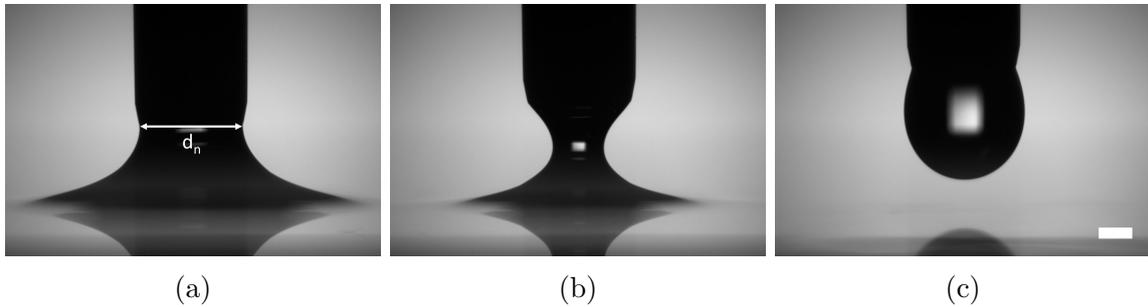


FIGURE 3.2.7 – Photographie de l'injecteur à différentes positions par rapport à la surface libre du bain : (a) 2,3 mm, (b) 3 mm et (c) 4 mm. Le débit d'extrusion est de  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$ . La barre d'échelle représente 1 mm

Si notre buse est immergée dans le bain gélifiant, un tube se forme dans le bain. Cependant, à de faibles débits, on observe une obstruction de la buse causée par la diffusion des ions calcium. Pour éviter la diffusion des ions dans la buse, elle est éloignée de la surface du bain et nous remarquons que, malgré un régime de goutte à goutte, si l'extrémité de la buse d'extrusion est placée à une distance assez proche du bain, il se crée un pont liquide et un jet est formé dans le bain qui est stable jusqu'à une hauteur critique  $h_c$  (figure 3.2.7). Cette stabilisation de la goutte pendante, permet de former des fibres sans que la buse ne touche directement le bain gélifiant. Si nous continuons à rapprocher la buse du bain, il existe une hauteur au-delà de laquelle le bain entre en contact avec la buse, et où la formation de tube ne sera plus possible. Ces deux valeurs de  $h$  varient selon le débit d'extrusion total ( $q_{total}$ ) et nous permettent d'établir un diagramme d'existence du tube (figure 3.2.8). À un même débit, un  $h$  trop faible provoquera l'obstruction de la buse et le pont liquide se casse à une  $h_c$  qui augmente lorsque  $q_{total}$  augmente. Le pont liquide est caractérisé par un diamètre minimal ( $d_n$ ), le cou du ménisque, qui dépend de la distance entre la buse et la surface libre du bain et du débit.

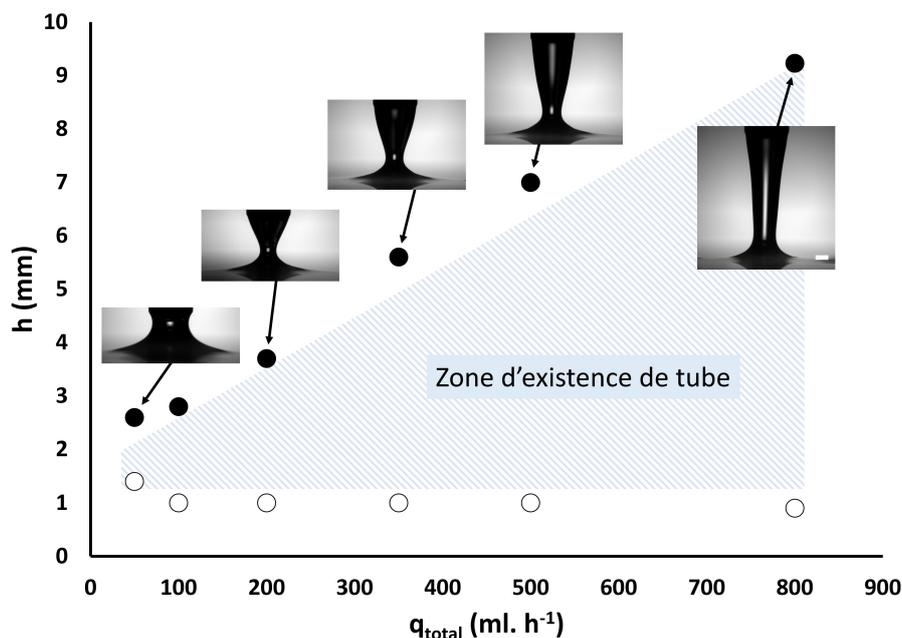


FIGURE 3.2.8 – Diagramme d'existence du tube d'alginate. La hauteur maximale avant la rupture du pont liquide ( $h_c$ ) est représentée par ● et la hauteur minimale avant la gélification dans la buse est représenté par ○. Le diamètre interne du tube externe de la buse est de 3,3 mm et la barre d'échelle représente 1 mm.

### 3.2.3.2 Importance de la densité des solutions

Nous remarquons aussi que, pendant la co-extrusion d'une phase externe composée d'une solution d'alginate et d'une phase interne d'eau ultra-pure, le tube d'alginate ne reste pas verticalement dans le bain et qu'il n'est pas entièrement immergé dans le bain. En effet il semble flotter à la surface du bain. Après gélification complète, nous découpons le tube à l'aide d'une paire de ciseaux pour observer une coupe transversale du tube : bien que l'extérieur du tube soit bien cylindrique, l'intérieur du tube a une forme de demi-cercle. Comme nous l'avons calculé précédemment, le temps nécessaire aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour diffuser à travers toute l'épaisseur d'alginate est de près de 8 minutes. Durant ce temps, l'alginate va diffuser dans la phase interne mais elle va aussi couler à l'intérieur du tube sous l'effet de la gravité. Il est donc nécessaire de maintenir le tube à la verticale pour que l'intérieur du tube conserve une forme circulaire, ce qui peut être obtenu en augmentant la densité du fluide interne pour que la densité des fluides extrudés soit la même que celle du bain. Ainsi, le tube ne flottera pas, et le diamètre du tube ne dépendra pas de la gravité. Du glucose est alors ajouté à 2 % m/v dans l'eau ultra-pure pour atteindre une densité de 1,0081 ( $\pm 0,0005$ ) qui est aussi celle de la solution d'alginate à 1,6 % et du bain de calcium à 100 mM. Cette molécule

est assez petite pour diffuser à travers les pores de la membrane d'hydrogel et elle ne possède pas d'interaction avec l'alginate, ainsi elle pourra être aisément rincée.

### 3.3 Description de l'extrusion dans l'eau

Afin de simplifier le système, nous allons d'abord tenter de caractériser l'extrusion d'une solution visqueuse d'alginate dans bain composé d'eau ultra-pure, afin de comprendre le comportement du pont liquide en condition non gélifiante. Dans un premier temps, nous nous intéressons à l'extrusion simple d'une solution d'alginate, puis nous complexifierons le système en rajoutant une phase interne aqueuse.

#### 3.3.1 Stabilité du pont liquide dans l'eau

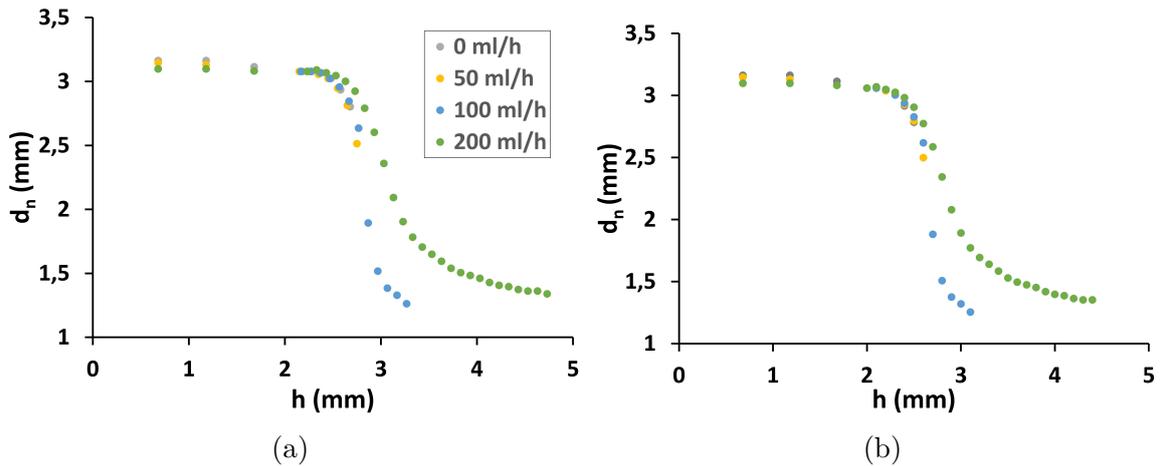


FIGURE 3.3.1 – Évolution du diamètre du cou du ménisque ( $d_n$ ) en fonction de la hauteur de la buse d'extrusion ( $h$ ) à différents débits d'extrusion de fluide en (a) extrusion simple et (b) en co-extrusion avec un rapport de débits de 1

Si aucun flux n'est appliqué, nous sommes dans le cas d'un ménisque statique et la forme du pont liquide est le résultat de l'équilibre entre la pression hydrostatique et la pression capillaire [66]. Lorsque nous éloignons la position de l'injecteur par rapport à la surface libre du bain,  $d_n$  diminue jusqu'à ce que le pont liquide se casse (figure 3.3.1a). Si de l'alginate est mise en écoulement, nous remarquons que plus le débit d'extrusion est rapide, plus le pont liquide est stabilisé sur de plus grandes hauteurs. Nous remarquons également que le cou du pont liquide s'affine rapidement au-delà d'environ 2,5 mm puis plus progressivement au-delà de 3 mm pour les débits plus élevés. Si nous comparons les courbes obtenues en co-extrusion (figure 3.3.1b) à celles

obtenues en extrusion simple (figure 3.3.1a), nous remarquons que  $h_c$  est plus faible pour tous les débits.

### 3.3.1.1 Analyse théorique

Nous cherchons donc à comprendre les phénomènes à l'origine de la formation du pont liquide et de sa stabilité par une analyse théorique basée sur les données expérimentales obtenues.

#### 3.3.1.1.1 Pont liquide statique

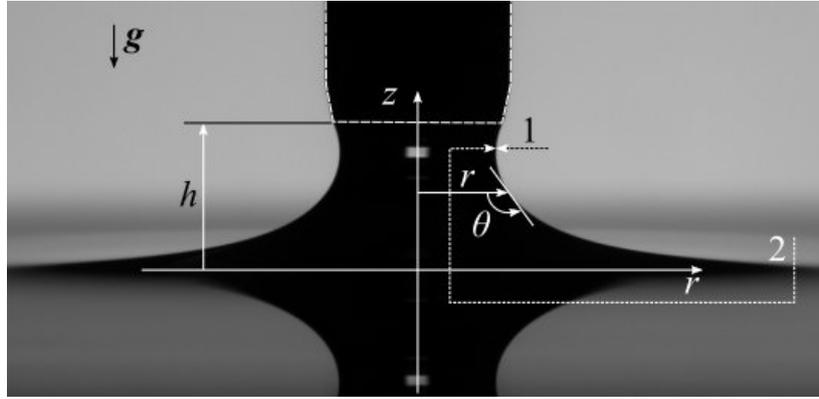


FIGURE 3.3.2 – Photographie d'un pont liquide formé par une solution d'alginate entre l'injecteur et le bain d'eau.

Pour les conditions statiques, la forme du pont liquide résulte de l'équilibre entre la pression hydrostatique et la pression capillaire [66]. Lorsque l'interface est incurvée, il existe un saut de pression  $\Delta p$ , appelé la pression de Laplace, entre le gaz et le liquide qui est relié à la tension interfaciale  $\gamma$  et la courbure de la surface  $\mathcal{C}$

$$\Delta p = \gamma \mathcal{C}. \quad (3.3.1)$$

Pour un volume de fluide axisymétrique, la courbure en coordonnées cartésiennes de la surface située à  $r(z)$  (figure 3.3.2) est

$$\mathcal{C} = \frac{1}{r(1+r'^2)^{1/2}} - \frac{r''}{(1+r'^2)^{3/2}}, \quad (3.3.2)$$

où  $r' = dr/dz$  et  $r'' = d^2r/dz^2$ . En notant  $s$  la coordonnée curviligne et  $\theta$  l'angle entre

l'axe  $r$  (l'axe horizontal), et la tangente à la surface libre, la courbure est alors

$$\mathcal{C} = \frac{\sin \theta}{r} - \frac{d\theta}{ds}. \quad (3.3.3)$$

L'équation à résoudre pour obtenir la forme du pont liquide peut être dérivée en considérant les deux voies indiquées dans la figure 3.3.2 [67]. En suivant la voie 1, la pression  $p$  dans le liquide, située en  $(r, z)$  est

$$p = p_0 + \gamma \left( \frac{\sin \theta}{r} - \frac{d\theta}{ds} \right), \quad (3.3.4)$$

où  $p_0$  est la pression atmosphérique. En suivant la voie 2, la pression est

$$p = p_0 - \rho g z, \quad (3.3.5)$$

où  $\rho$  est la densité du liquide et  $g$  l'accélération gravitationnelle. Des équations 3.3.4 et 3.3.5, nous obtenons une équation pour  $\theta$  :

$$\frac{d\theta}{ds} = \frac{\sin \theta}{r} + \frac{\rho g}{\gamma} z. \quad (3.3.6)$$

En utilisant la longueur capillaire  $l_c = \sqrt{\gamma/\rho g}$  comme une échelle de longueur caractéristique, la forme adimensionnée de l'équation 3.3.6 est

$$\frac{d\theta}{d\tilde{s}} = \frac{\sin \theta}{\tilde{r}} + \tilde{z}. \quad (3.3.7)$$

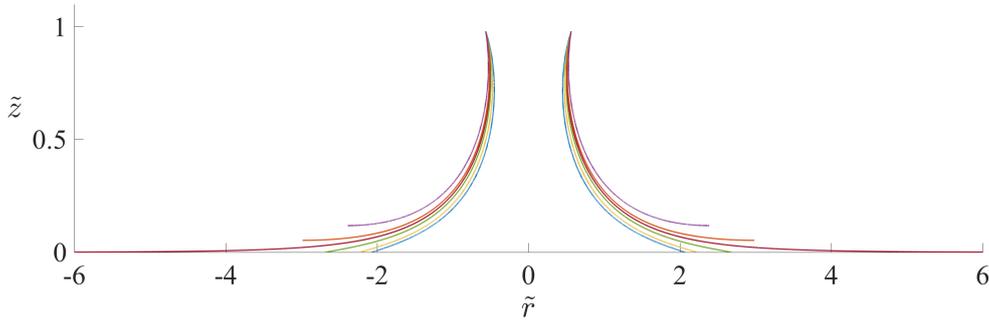


FIGURE 3.3.3 – Formes du pont liquide donné par l'équation 3.3.7 pour différentes valeurs d'angle  $\theta_0$  à l'extrémité de l'injecteur, de  $45^\circ$  à  $65^\circ$  par pas de  $5^\circ$  et incluant l'angle optimal égal à  $57,89^\circ$  avec  $\tilde{h} = 0,98$  et  $\tilde{d}_e = 1,13$ .

Pour une hauteur donnée  $\tilde{h}$  entre l'extrémité de l'injecteur et la surface libre et un

diamètre externe de l'injecteur  $\tilde{d}_e$ , l'équation 3.3.7 est résolue numériquement par la méthode des différences finies à partir de  $\tilde{z} = \tilde{h}$  et en utilisant les relations géométriques suivantes :

$$\begin{aligned} d\tilde{r} &= -\cos\theta d\tilde{s}, \\ d\tilde{z} &= -\sin\theta d\tilde{s}. \end{aligned}$$

L'angle à l'extrémité de l'injecteur  $\theta_0 = \theta(\tilde{d}_e/2, \tilde{h})$  est ajusté de sorte que le minimum de  $\tilde{z}$  tende vers zéro (Figure 3.3.3).

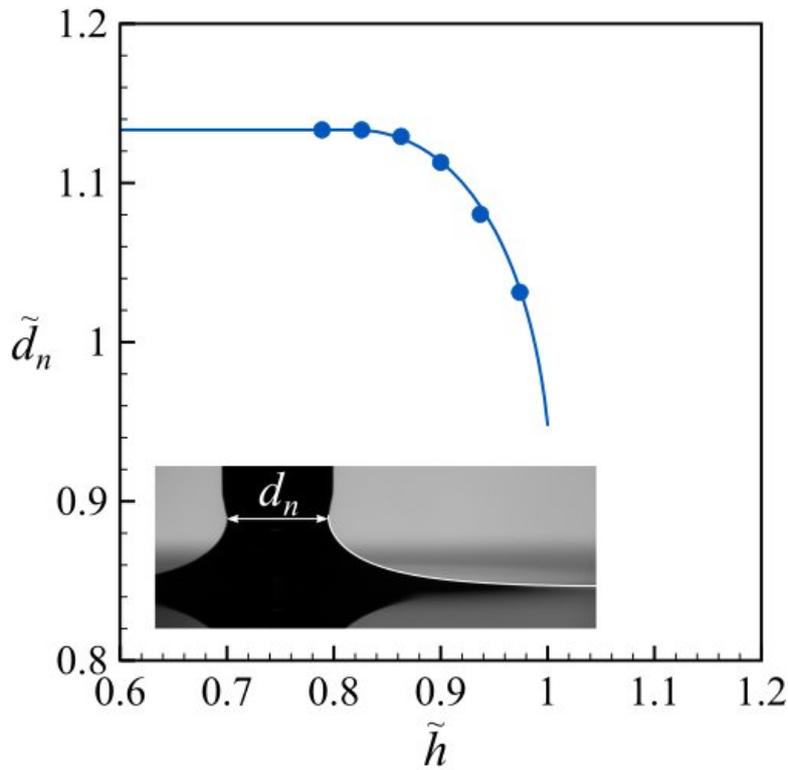


FIGURE 3.3.4 – Diamètre du cou normalisé  $\tilde{d}_n$  en fonction de la hauteur normalisée  $\tilde{h}$  avec  $\tilde{d}_e = 1,13$ . Les points représentent les données expérimentales et la ligne continue est évaluée à partir des formes théoriques. Encart : Photographie d'un pont liquide formé par une solution d'alginate entre l'injecteur et le bain d'eau. La ligne blanche continue est donnée par l'équation 3.3.7.

La forme du pont liquide est évaluée pour le cas d'une buse d'injecteur ayant un diamètre interne  $d_i$  de 3 mm et un diamètre externe  $d_e$  de 3,06 mm. En considérant la valeur de la tension de surface de la solution d'alginate sur un temps court comme correspondant à celle de l'eau pure,  $\gamma = 72$  mN/m, la longueur capillaire  $l_c$  est de 2,7 mm. Le diamètre externe normalisé de l'injecteur  $\tilde{d}_e$  est donc égal à 1,13. Lorsque l'injecteur

est déplacé vers le haut, la courbure dans le plan  $\{\tilde{x}, \tilde{y}\}$  augmente pour contrebalancer la pression hydrostatique à la pointe de l'injecteur qui est proportionnelle à  $\tilde{h}$ . Au-delà d'une certaine hauteur  $\tilde{h}_n$ , la courbure augmente de sorte que le diamètre minimal du pont liquide  $\tilde{d}_n$  devient plus petit que  $\tilde{d}_e$ . Le pont liquide commence à se pincer. Puis, au-delà d'une hauteur critique  $\tilde{h}_c$ , le pont liquide est instable et se brise. Les évolutions théorique et expérimentale de  $\tilde{d}_n$  en fonction de  $\tilde{h}$  ainsi qu'une comparaison de la forme complète prédite et mesurée du pont liquide sont reportées dans la figure 3.3.4. Une correspondance entre l'expérimental et la théorie est trouvée. Les deux hauteurs caractéristiques sont  $\tilde{h}_n = 0,82$  et  $\tilde{h}_c = 1$ , correspondant à 2,2 mm et 2,7 mm, respectivement.

### 3.3.1.1.2 Pont liquide dynamique

L'impact de l'écoulement d'un fluide visqueux sur la forme d'un pont liquide est maintenant discuté. Lorsque la hauteur de l'injecteur est bien au-delà de la hauteur critique  $h_c$  du pont liquide statique, la partie au-dessus du cou d'un pont liquide dynamique ressemble à un jet liquide rétrécissant. Cette portion est analysée dans un premier temps.

Dans le cas d'un jet mince axisymétrique, c'est-à-dire dont la section transversale varie lentement, l'équation de Navier-Stokes peut être approximée par l'équation à une dimension suivante [68] :

$$\rho \left( \frac{\partial u}{\partial t} + u \frac{\partial u}{\partial z} \right) = -\gamma \frac{\partial \mathcal{C}}{\partial z} + \frac{3\eta}{r^2} \frac{\partial}{\partial z} \left( r^2 \frac{\partial u}{\partial z} \right) + \rho g, \quad (3.3.8)$$

et la conservation de la masse pour un fluide incompressible s'écrit

$$\frac{\partial r^2}{\partial t} + \frac{\partial ur^2}{\partial z} = 0, \quad (3.3.9)$$

où  $r$  est le rayon du jet liquide. Cela implique que la seule composante de vitesse pertinente  $u$  est celle qui suit l'axe du jet  $\{z\}$  et ne dépend pas de la position radiale, comme pour un écoulement de type bouchon. Cela est aussi justifié dans la situation présente puisque le profil de l'écoulement relaxe d'une forme parabolique à la forme bouchon lorsque la condition aux limites à la sortie de l'injecteur passe de non-glissement à sans frottements, à une échelle de temps  $t_\nu$  donnée par la diffusion de la vorticité sur le rayon du jet,  $t_\nu = (r_i)^2/\nu$  où  $\nu$  est la viscosité cinématique de l'ordre de 2,6 ms. Pour un débit typique  $q$  de 200 ml.h<sup>-1</sup>, correspondant à une vitesse moyenne  $U = 4q/(\pi d_i^2)$  égale à 7,9 mm.s<sup>-1</sup>, le profil bouchon est atteint à une distance  $Ut_\nu$  de l'extrémité

de l'injecteur de l'ordre de  $20 \mu\text{m}$ . L'écoulement est donc purement élongationnel. Le premier terme à gauche de l'équation 3.3.8 et de l'équation 3.3.9 peuvent être retirés puisque l'on considère un état stationnaire. Le premier terme à droite de l'équation 3.3.8 correspond au gradient de pression capillaire. Le second provient de la contrainte visqueuse. Le facteur 3 est typique d'un écoulement élongationnel uni axial où les taux de déformation radiale et axiale sont proportionnels.  $3\eta$  est appelé viscosité de Trouton [69]. Le dernier terme est lié à la gravité. Ici, l'axe  $z$  pointe vers le bas, selon la direction de la gravité, et l'extrémité de l'injecteur définit l'origine  $z = 0$ .

Pour un écoulement stationnaire, l'équation de la conservation de la masse peut être intégrée et elle devient

$$\pi r^2 u = q, \quad (3.3.10)$$

où  $q$  est le débit imposé.

Comme pour l'état statique, nous décrivons le pont liquide en utilisant l'angle  $\theta$  entre la surface libre et l'horizontale, le rayon  $r$  du pont liquide et la coordonnée curviligne  $s$ . Cela permet une résolution numérique de l'équation 3.3.8 en utilisant l'expression complète de la courbure donnée par l'équation 3.3.3. Nous notons maintenant que  $dz = \sin \theta ds$  et donc  $dr/dz = -\cot \theta$ . Le gradient de la courbure est maintenant exprimé ainsi

$$\frac{d\mathcal{C}}{dz} = \frac{d}{dz} \left( \frac{\sin \theta}{r} - \frac{d\theta}{ds} \right) \quad (3.3.11)$$

$$= -\frac{\sin \theta}{r^2} \frac{dr}{dz} + \frac{\cos \theta}{r} \frac{d\theta}{dz} - \frac{d^2\theta}{dz ds} \quad (3.3.12)$$

$$= \frac{\cos \theta}{r^2} + \frac{\cot \theta}{r} \frac{d\theta}{ds} - \frac{1}{\sin \theta} \frac{d^2\theta}{ds^2}, \quad (3.3.13)$$

et la dérivée de  $u$ , en utilisant l'équation 3.3.10 est

$$\frac{du}{dz} = \frac{d}{dz} \left( \frac{q}{\pi r^2} \right) \quad (3.3.14)$$

$$= -\frac{2q}{\pi r^3} \frac{dr}{dz} \quad (3.3.15)$$

$$= \frac{2q}{\pi r^3} \cot \theta. \quad (3.3.16)$$

L'équation de la quantité de mouvements s'écrit donc

$$\frac{2\rho q^2}{\pi^2 r^5} \cot \theta = -\gamma \left( \frac{\cos \theta}{r^2} + \frac{\cot \theta}{r} \frac{d\theta}{ds} - \frac{1}{\sin \theta} \frac{d^2\theta}{ds^2} \right) + \frac{6\eta q}{\pi r^4} \left( \cot^2 \theta - \frac{r}{\sin^3 \theta} \frac{d\theta}{ds} \right) + \rho g. \quad (3.3.17)$$

Nous allons maintenant exprimer l'équation de la conservation de la quantité de mouvements sous une forme sans dimensions. Comme précédemment, nous utilisons la longueur capillaire  $l_c = \sqrt{\gamma/\rho g}$  comme une échelle de longueur caractéristique. Pour l'échelle de vitesse, nous utilisons la vitesse de chute libre évaluée sur  $l_c$ , i.e.  $v_c = \sqrt{g l_c}$ . Ainsi, la viscosité dynamique adimensionnée s'écrit  $\eta(g/\rho\gamma^3)^{1/4}$ . Nous avons donc l'équation sans dimensions suivante :

$$\frac{2\tilde{q}^2}{\tilde{r}^5} \cot \theta = -\frac{\cos \theta}{\tilde{r}^2} - \frac{\cot \theta}{\tilde{r}} \frac{d\theta}{d\tilde{s}} + \frac{1}{\sin \theta} \frac{d^2\theta}{d\tilde{s}^2} + \frac{2\tilde{q}}{Ka^{3/4}\tilde{r}^4} \left( \cot^2 \theta - \frac{\tilde{r}}{\sin^3 \theta} \frac{d\theta}{d\tilde{s}} \right) + 1, \quad (3.3.18)$$

où

$$\tilde{q} = \tilde{u}\tilde{r}^2 = \frac{q}{\pi v_c l_c^2}, \quad (3.3.19)$$

et

$$Ka = \frac{\gamma}{\rho g^{1/3} \nu_T^{4/3}} \quad (3.3.20)$$

est le nombre de Kapitsa établi à partir de la viscosité de Trouton  $\nu_T = 3\nu$ , où  $\nu = \eta/\rho$  est la viscosité cinématique. Comme précédemment, l'équation 3.3.18 est résolue numériquement par la méthode des différences finies à partir de la pointe de l'injecteur située en  $\tilde{z} = 0$ , ou  $\tilde{s} = 0$ . Maintenant, deux conditions initiales à  $\tilde{s} = 0$  sont nécessaires : l'angle initial  $\theta_0 = \theta(0)$  et sa dérivée première  $\theta'_0 = d\theta(0)/d\tilde{s}$  qui correspond à la courbure dans le plan  $\{\tilde{r}, \tilde{z}\}$ .

Des profils théoriques du jet liquide sont montrés en figure 3.3.5a pour différents  $\theta_0$  allant de  $45^\circ$  à  $90^\circ$  par pas de  $5^\circ$  pour  $\tilde{d}_e = 2\tilde{r}(0) = 1, 13$ ,  $\tilde{q} = 0, 0148$ , qui correspond à  $q = 200 \text{ ml.h}^{-1}$  pour une solution d'alginate caractérisée par  $Ka = 0, 092$ . Ici,  $\theta'_0$  est fixée à  $-1^\circ$ . L'amincissement du jet induit par la gravité est plus rapide lorsque l'angle initial devient plus petit. L'influence de la courbure initiale est montrée en figure 3.3.5b pour une valeur fixée de  $\theta_0$  égale à  $70^\circ$ . Le jet s'affine pour des grandes valeurs de  $\theta'_0$  et évolue très peu pour  $\theta'_0$  plus petit que  $1^\circ$ .

Les photographies du pont liquide obtenu à différentes hauteurs par l'écoulement d'une solution d'alginate à un débit de  $200 \text{ ml.h}^{-1}$  à travers un biopsy punch de  $3 \text{ mm}$  de diamètre interne sont montrées sur la figure 3.3.6 avec les prédictions théoriques de la forme de la surface libre, soit par l'équation 3.3.7, quand l'écoulement est négligé, pour des petits  $h$  ou par l'équation 3.3.18 pour de plus grandes distances entre l'injecteur et la surface libre. Pour des hauteurs modérées, en dessous de  $\tilde{h} = 0, 8$ , le pont liquide est toujours bien décrit par une description statique. Pour de plus grandes hauteurs la partie supérieure est alors mieux décrite par le modèle à une dimension jusqu'à la position du cou où le diamètre du pont est minimal. À partir de ce point, la

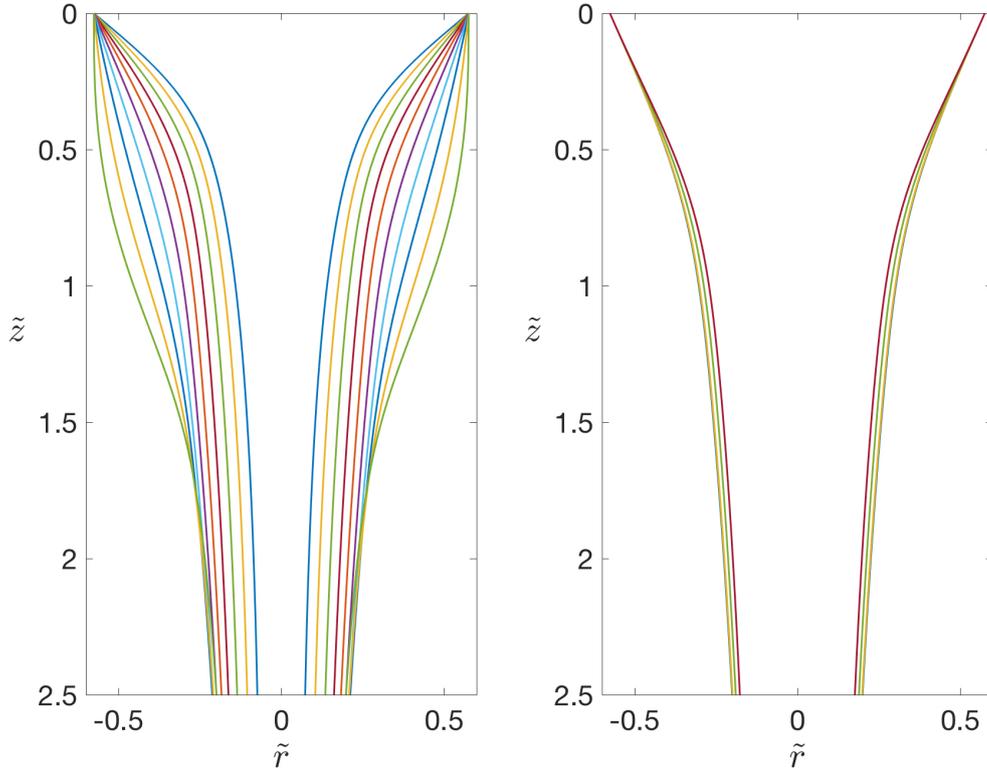


FIGURE 3.3.5 – Formes du pont liquide données par l'équation 3.3.18 pour (a) différentes valeurs d'angle  $\theta_0$  à la pointe de l'injecteur entre  $45^\circ$  et  $90^\circ$  par pas de  $5^\circ$  où  $\theta'_0 = -1^\circ$  avec  $\tilde{d}_e = 1, 14$ ,  $Ka = 0,092$  et  $\tilde{q} = 0,0148$  et (b) différentes valeurs  $\theta'_0$  ( $-0,5^\circ$ ,  $-1^\circ$ ,  $-5^\circ$ ,  $-10^\circ$ ) à  $\theta_0 = 70^\circ$ .

forme du ménisque statique est aussi évaluée et tracée dans la figure 3.3.6. Le modèle statique surestime la hauteur du ménisque avec une déviation qui augmente avec  $h$ , probablement en lien avec une augmentation de la vitesse du fluide due à la gravité. Dans cette région, le liquide s'étale dans la direction radiale et ainsi, la composante radiale du flux devient prépondérante par rapport à la composante verticale, s'éloignant ainsi du modèle à une dimension discuté jusque-là.

Comme nous l'avons discuté précédemment, la présence d'un bain liquide proche de la pointe de l'injecteur permet la stabilisation d'un jet liquide jusqu'à une hauteur critique qui augmente avec le débit. Le critère de stabilité d'un tel pont liquide a récemment été adressé pour un jet visqueux entrant dans un bain du même liquide [70]. Puisque le flux de base dépend de  $z$  à cause de la gravité, les auteurs procèdent à une analyse de la stabilité globale et obtiennent un nombre de Weber critique du jet  $We_c$  en dessous duquel le jet est stable et dépend de la hauteur  $h$ . Le nombre de Weber critique est aussi montré comme fonction du nombre de Kapitza. Dans nos expériences,

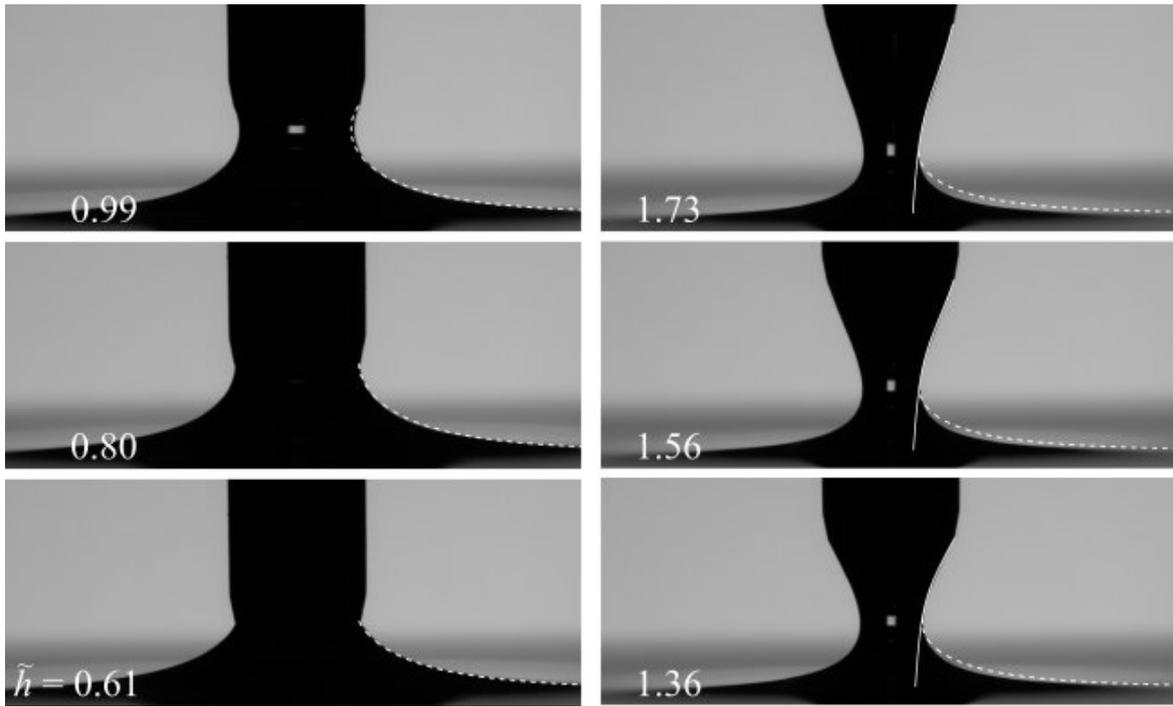


FIGURE 3.3.6 – Ponts liquides à différentes hauteurs obtenus par l'écoulement d'une solution d'alginate dans de l'eau à un débit de  $200 \text{ ml.h}^{-1}$ . Le trait en pointillés blancs a été obtenu par l'équation 3.3.7 et le trait plein blanc a été obtenu à partir de l'équation 3.3.18. La hauteur normalisée par la longueur capillaire  $\tilde{h}$  est indiquée sur chaque image et le diamètre du haut de la buse est de  $3,39 \text{ mm}$ .

le débit est imposé et nous cherchons la hauteur critique pour laquelle le pont liquide se rompt. Ainsi, la frontière de stabilité, ou ligne de stabilité marginale, dans le plan  $\{h/r_i, We\}$  peut être évaluée. Les résultats pour différentes tailles d'injecteur sont tracés dans la figure 3.3.7a. Les données semblent converger vers une unique courbe et nous notons aussi que la présence de calcium dans le bain, et donc la solidification de l'alginate à la base du pont, n'a pas d'impact sur la limite de la stabilité. Les limites de stabilité théoriques, données par l'équation 3.2.4, obtenues pour la plus petite et la plus grande taille d'injecteur sont montrées. Nous notons que l'équation 3.2.4 sous-estime le nombre de Weber critique mais des expériences complémentaires doivent être menées pour explorer cette région qui n'est pas pertinente dans la fabrication de tubes d'hydrogel.

L'effet d'une phase interne moins visqueuse sur la position de la ligne de stabilité marginale a aussi été explorée. Les résultats pour différents ratio de débits des phases interne/externe  $r_q = q_i/q_e$  pour  $d_i = 3,3 \text{ mm}$  sont montrés dans la figure 3.3.7b. Ici, la frontière de la stabilité se déplace vers la gauche lorsque  $r_q$  augmente, signifiant que  $We_c$  augmente à une hauteur  $h$  fixée. Même si les solutions ne sont pas mélangées,

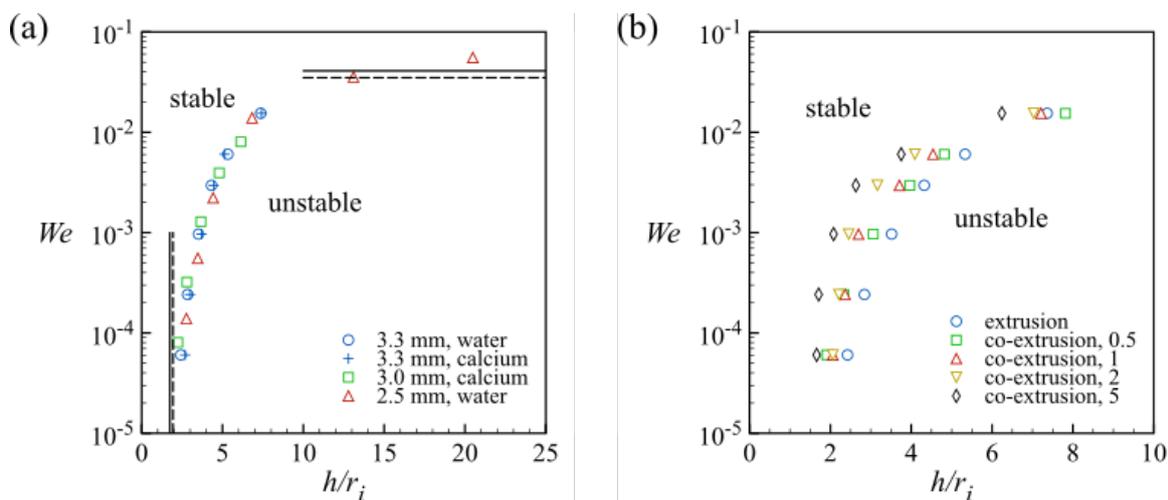


FIGURE 3.3.7 – Nombre de Weber critique en fonction de la hauteur critique de l'injecteur normalisé par le rayon interne (a) pour l'extrusion d'une solution d'alginate à travers différentes tailles de buses et avec ou sans calcium dans le bain et (b) pour la co-extrusion de solutions d'alginate et de glucose à de différents ratio de débits (interne/externe) et pour un diamètre de l'injecteur  $d_i = 3,3$  mm. Les lignes verticales continue et pointillée désignent les limites statiques pour  $d_i$  égal à 2,5 mm et 3,3 mm, respectivement. Les lignes horizontales continue et pointillée sont les nombres de Weber critiques pour un jet non-confiné déduits de l'équation 3.2.4 pour  $d_i$  égal à 2,5 mm et 3,3 mm, respectivement.

cette tendance peut être interprétée par la diminution de la viscosité effective, liée au ratio de volumes, et donc de débits, des deux solutions qui résulte en un plus faible nombre de Ohnesorge et donc un plus grand nombre de Weber critique comme prédit par l'équation 3.2.4.

### 3.3.2 Pas de formation de jet dans un bain d'eau

Si l'on regarde dans le bain d'eau pure (figure 3.3.8b), nous n'observons pas de formation de jet mais un étalement de la solution injectée dans le bain qui se déstabilise sous la forme d'une colonne initiée par la différence de densité entre la solution d'alginate et l'eau pure. Sébilleau et al. ont montré que pour des écoulements à faible nombre de Reynolds ( $Re < 60$ ) d'un fluide dans un bain contenant le même fluide, les lignes de courant suivent la surface libre du bain (figure 3.3.9) [71], il y a donc un étalement du fluide extrudé (figure 3.3.9). Le nombre de Reynolds compare les forces inertielle et visqueuse :

$$Re = \frac{vL_c}{\nu}$$

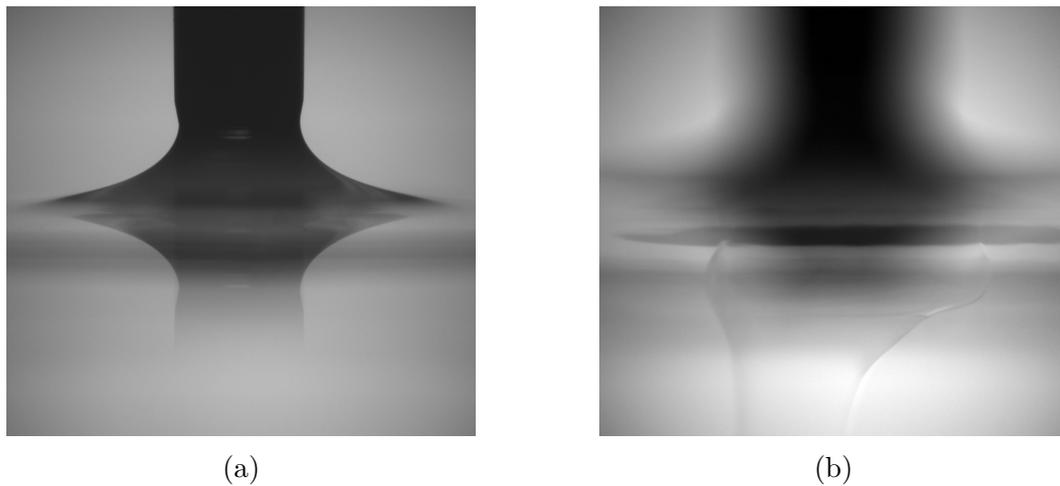


FIGURE 3.3.8 – Image de l'extrusion d'alginate à un débit de  $200 \text{ ml.h}^{-1}$  dans un bain composé d'eau : (a) vue dans l'air du pont liquide et (b) vue dans le bain. Le diamètre interne du tube externe de la buse est de 3 mm, et  $h = 2 \text{ mm}$ .

où  $v$  est la vitesse de l'écoulement,  $L_c$  une dimension caractéristique de l'écoulement, ici le diamètre de la buse, et  $\nu$  la viscosité cinématique de la solution. Nous calculons donc  $Re = 3 \cdot 10^{-3} < 60$  qui suggère que si l'on veut la création d'un jet vertical dans le bain, nous devons initier une séparation des lignes de courant.

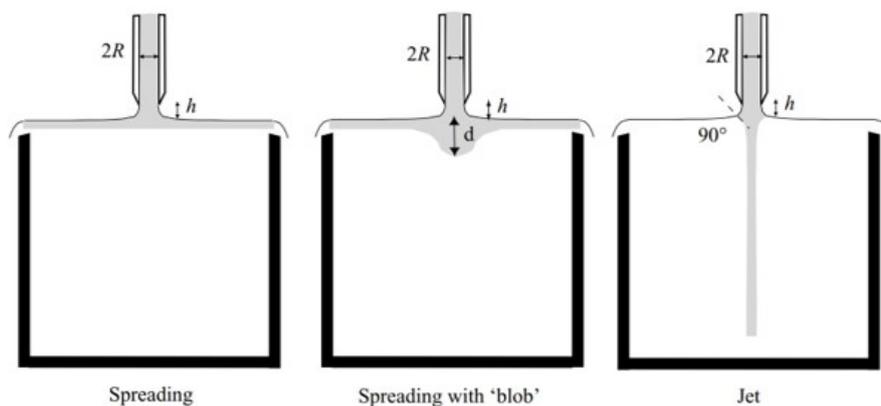


FIGURE 3.3.9 – Schéma montrant l'effet du débit, du plus lent (à gauche) au plus rapide (à droite) sur l'établissement d'un jet liquide dans le bain [71]

## 3.4 Extrusion dans un bain de calcium

### 3.4.1 Extrusion d'une fibre d'alginate

Lorsque du calcium est rajouté au bain à une concentration de 100 mM, nous observons dans le bain la formation d'une fibre de diamètre  $d_t$  (figure 3.4.1b). Cela suggère que dans un système à bas nombre de Reynolds, le jet peut être entraîné grâce à la transition sol-gel. Lorsque nous observons l'évolution de la fibre dans le bain en fonction de la hauteur d'extrusion (figure 3.4.2), nous remarquons que  $d_t$  ne suit pas proportionnellement la courbe de  $d_n$ . Cependant il existe une tendance. Lorsque le diamètre  $d_n$  commence à diminuer, vers une hauteur de 2,1 mm, nous observons un accroissement rapide du diamètre du tube résultant et ensuite le passage par un maximum suivi d'une diminution de la taille. De plus, plus le débit augmente, plus le diamètre du tube pour une même hauteur augmente. Ces résultats montrent qu'il y a une compétition entre l'étalement de l'alginate à la surface du bain et la diffusion du calcium qui induit une solidification de l'alginate et ainsi une séparation de la ligne de courant de la surface libre. Il est donc possible de contrôler  $d_t$  en modifiant le débit ou la hauteur d'extrusion.

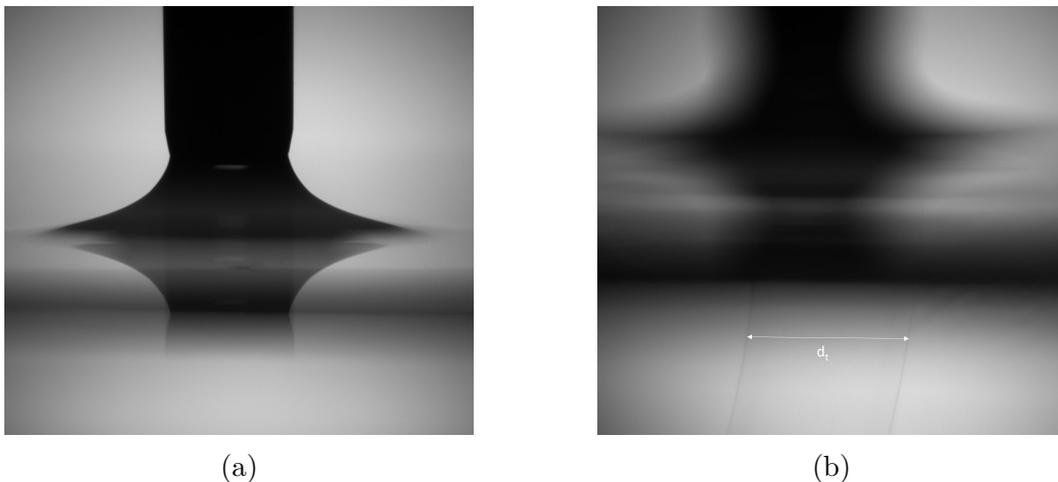


FIGURE 3.4.1 – Image de l'extrusion d'alginate à un débit de  $200 \text{ ml.h}^{-1}$  dans un bain composé de chlorure de calcium à une concentration de 100 mM : (a) vue dans l'air du pont liquide et (b) vue dans le bain. Le diamètre interne de la buse est de 3 mm, et  $h = 2 \text{ mm}$ .

Ainsi, si nous fixons un débit, la variation de la hauteur d'extrusion permettrait donc d'ajuster le diamètre de la fibre. Cette expérience nous permet donc de décider d'un débit de travail qui doit suffisamment stabiliser le pont liquide afin d'offrir une grande diversité de  $d_t$ , mais ne doit pas être trop grand car nous voulons éviter la

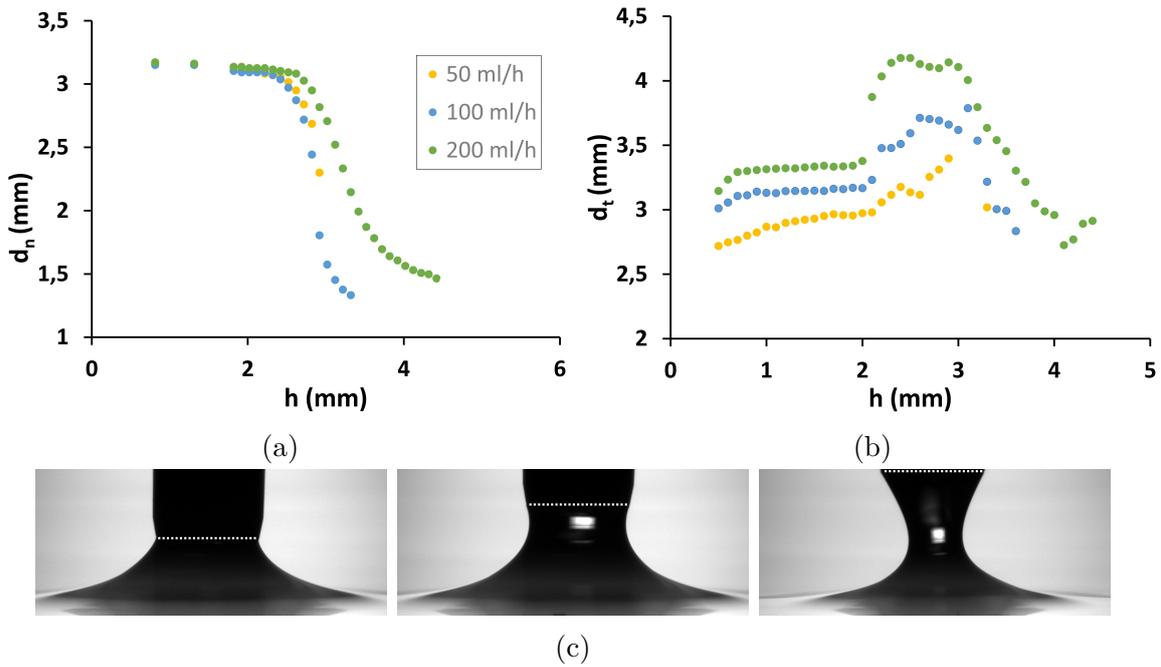


FIGURE 3.4.2 – Évolution (a) du diamètre du cou du ménisque ( $d_n$ ) et (b) du diamètre de la fibre dans le bain ( $d_t$ ) en fonction de la hauteur de la buse d'extrusion ( $h$ ) à différents débits d'extrusion de fluide. Des photographies du pont liquide à différentes hauteurs pour une extrusion à un débit de  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$  sont représentées en (c). De gauche à droite, les hauteurs sont 1,8, 2,8 et 3,8 mm. Une solution d'alginate est extrudée dans un bain de solution de calcium de concentration 100 mM. Le diamètre interne de la buse est de 3 mm.

torsion des tubes d'alginate dans le bain. Nous décidons donc de travailler à un débit  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$ , malgré les instabilités observables sur le diamètre du tube dans la courbe verte en figure 3.4.2b qui sont dues au contact du tube avec le fond de la cuve. Par ailleurs, nous remarquons qu'il est possible d'extruder une fibre en plaçant l'injecteur directement dans le bain gélifiant, ce qui n'est pas possible dans le cas d'une co-extrusion (figure 3.2.8).

### 3.4.1.1 Proposition d'un mécanisme de formation de la fibre

À partir des observations précédentes, nous proposons maintenant un mécanisme à l'origine de la formation d'une fibre solide dans le cas d'une extrusion de solution d'alginate à distance du bain gélifiant. Comme il a été décrit précédemment, l'extrusion d'une solution visqueuse comme l'alginate à travers une buse de rayon  $r_i = d_i/2$  au dessus d'une surface libre composée d'un bain liquide permet la formation d'un pont liquide dont le cou possède un rayon  $r_n$ . Pour un débit  $q$  insuffisant pour provoquer la séparation des lignes de courants (figure 3.3.9), cette extrusion permet la forma-

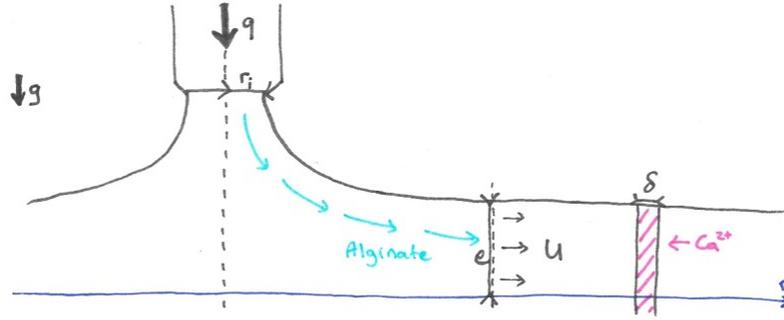


FIGURE 3.4.3 – Schéma descriptif du mécanisme de formation de la fibre d'alginate dans un bain gélifiant.

tion d'une nappe d'alginate d'un rayon  $r$  sur le bain de calcium. Afin de simplifier le problème, nous considérons dans un premier temps que l'interface entre les deux fluides est plane, et donc qu'à partir d'une certaine distance l'écoulement peut être considéré comme radial, de vitesse moyenne  $u$ , et l'épaisseur  $e$  de la nappe d'alginate est constante [72].

Pour un écoulement stationnaire d'épaisseur  $e$ , l'équation de la conservation de la masse s'écrit donc :

$$q = 2\pi r e u \quad (3.4.1)$$

En considérant la vitesse moyenne d'étalement du fluide  $u = dr/dt$ , nous obtenons ainsi l'équation suivante :

$$r \frac{dr}{dt} = \frac{q}{2\pi e} \quad (3.4.2)$$

qui peut aussi s'écrire

$$\frac{1}{2} \frac{dr^2}{dt} = \frac{q}{2\pi e} \quad (3.4.3)$$

et dont l'intégration est

$$r^2 = \frac{q}{\pi e} t + A. \quad (3.4.4)$$

Si l'on considère qu'à  $t = 0$ , à une distance  $r(0)$  l'écoulement est radial et uniforme, on suppose que  $r(0)$  est proportionnel au rayon du cou du pont liquide, ie.  $r(0) = \alpha r_n$ , la constante d'intégration  $A$  est donc égale à  $(\alpha r_n)^2$ .

Le fluide s'étale sur la surface libre du bain jusqu'à ce qu'il se forme une membrane d'hydrogel d'épaisseur  $\delta^*$  suffisamment solide pour arrêter l'écoulement. La formation de cette membrane dépend de la gélification de l'alginate grâce à la diffusion des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le temps maximal d'étalement du fluide  $t^*$  sur une distance  $r^*$  dépend donc de la réaction de gélification de l'alginate et donc de la diffusion du calcium sur l'épaisseur  $\delta^*$  :

$$t^* \sim \frac{\delta^{*2}}{D}. \quad (3.4.5)$$

Il est alors possible de déterminer un rayon critique d'étalement  $r^*$  et l'équation 3.4.4 s'écrit

$$r^* = ((\alpha r_n)^2 + \beta \frac{\delta^{*2} q}{D \pi e})^{1/2}. \quad (3.4.6)$$

Lorsque  $r^*$  est atteint, l'hydrogel possède une épaisseur de  $\delta^*$ , l'écoulement devient alors vertical et une fibre qui se gélifie se forme dans le bain. Ce modèle montre que lorsque le débit augmente, le rayon critique augmente aussi, ce qui concorde avec les observations expérimentales. De plus,  $r^*$  diminue lorsque  $r_n$  diminue, ce qui est en accord avec les observations de l'évolution de la taille du cou du pont liquide et de celle de la fibre lorsque la distance entre l'injecteur et le bain est augmentée (figure 3.4.2). Cependant, bien que ce modèle d'écoulement planaire permet de décrire les tendances, il est très simplifié car il ne prend pas en compte ni la forme du pont liquide, ni la forme réelle de l'interface alginate/bain qui est plutôt sphérique.

### 3.4.1.2 Influence de la concentration en calcium dans le bain

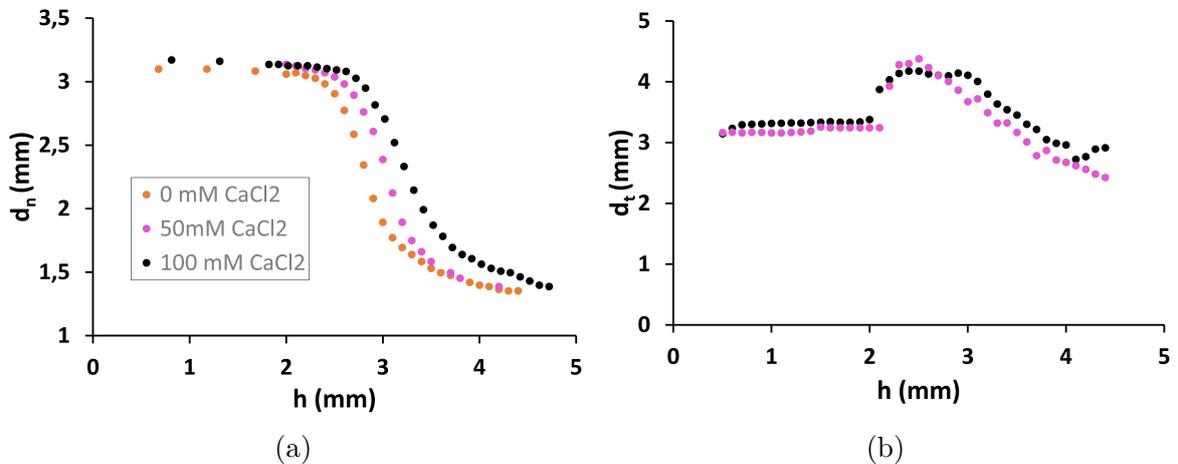


FIGURE 3.4.4 – Évolution (a) du diamètre du cou du ménisque ( $d_n$ ) et (b) du diamètre de la fibre dans le bain ( $d_t$ ) en fonction de la hauteur de la buse d'extrusion ( $h$ ) à  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$ , pour différentes concentrations de bain de calcium. Le diamètre externe de la buse est de 3 mm.

Puisque la transition sol-gel initie la formation d'un jet dans le bain, nous voulons comprendre l'influence de la concentration en calcium dans le bain. Dans ses travaux de thèse, Leslie Rolland a montré que la concentration de calcium nécessaire pour amorcer la transition sol-gel dans une solution d'alginate à 2 % est d'environ 10 mM

et qu'une concentration de 50 mM de calcium est nécessaire pour former un gel dur. Nous observons expérimentalement que lorsque la concentration du bain de calcium est de 20 mM, un jet commence à se former dans le bain. Ce jet est instable et en dessous d'une concentration de 50 mM, nous n'observons pas la formation d'une fibre d'alginate de diamètre homogène.

Bien qu'une différence soit observée au niveau du diamètre du cou du ménisque lorsque la solution d'alginate est extrudée dans un bain contenant 50 mM ou 100 mM de calcium (figure 3.4.4a), nous n'observons pas de différence au niveau de la formation de fibre dans le bain (figure 3.4.10b). Une concentration de 50 mM de calcium dans le bain serait donc suffisante pour figer le diamètre de la fibre d'alginate à son entrée dans le bain de gélification. Nous conserverons néanmoins la concentration de 100 mM pour la suite des expériences pour maintenir une iso-densité des solutions mais aussi car, comme nous l'avons vu précédemment en 3.2.1.1, la gélification de l'alginate repose sur la diffusion des ions. Une plus haute concentration en solutés augmentera le flux de diffusion des ions dans la couche d'alginate.

### 3.4.2 Co-extrusion d'un tube d'alginate

Grâce à la transition sol-gel, nous sommes capables de fabriquer des fibres d'alginate dans un système d'extrusion à faible débit. Le diamètre du cou du pont liquide dans l'air ( $d_n$ ) et celui de la fibre formée dans le bain ( $d_t$ ) dépendent du couple ( $h, q_{total}$ ). Ainsi, en imposant un débit, nous pouvons varier le diamètre de la fibre en changeant la hauteur de l'injecteur. Nous nous intéressons maintenant à la co-extrusion d'une phase interne aqueuse contenant 2 % m/v de glucose et d'une phase externe contenant 1,6% m/m d'alginate avec un rapport de débit de  $r_q = 1$ .

Tout comme pour l'extrusion simple, nous observons sur la figure 3.4.5 la diminution de  $d_n$  lorsque  $h$  augmente. Cependant, la gamme d'existence d'un tube est plus petite. En effet, pour des hauteurs inférieures à 2 mm, la production de tube par co-extrusion est impossible car il semblerait que le ménisque créé par le mouillage du bain sur le fluide injecté mouille aussi la buse de l'injecteur, car l'injecteur se bouche. Nous décidons de nouveau de travailler à un débit total de 200 ml.h<sup>-1</sup> car c'est la condition qui permet d'avoir une plus grande gamme de diamètres.

Les tubes d'alginate sont extrudés à différentes hauteurs d'extrusion puis maintenus verticalement pendant 15 minutes pour une première étape de gélification. Ils sont ensuite assez rigides pour être transférés dans une boîte de pétri et laissés dans une solution de calcium à 100 mM pendant une nuit. Le lendemain, les diamètres interne et externe de ces tubes ont été mesurés par l'analyse d'image de microscopie. Afin

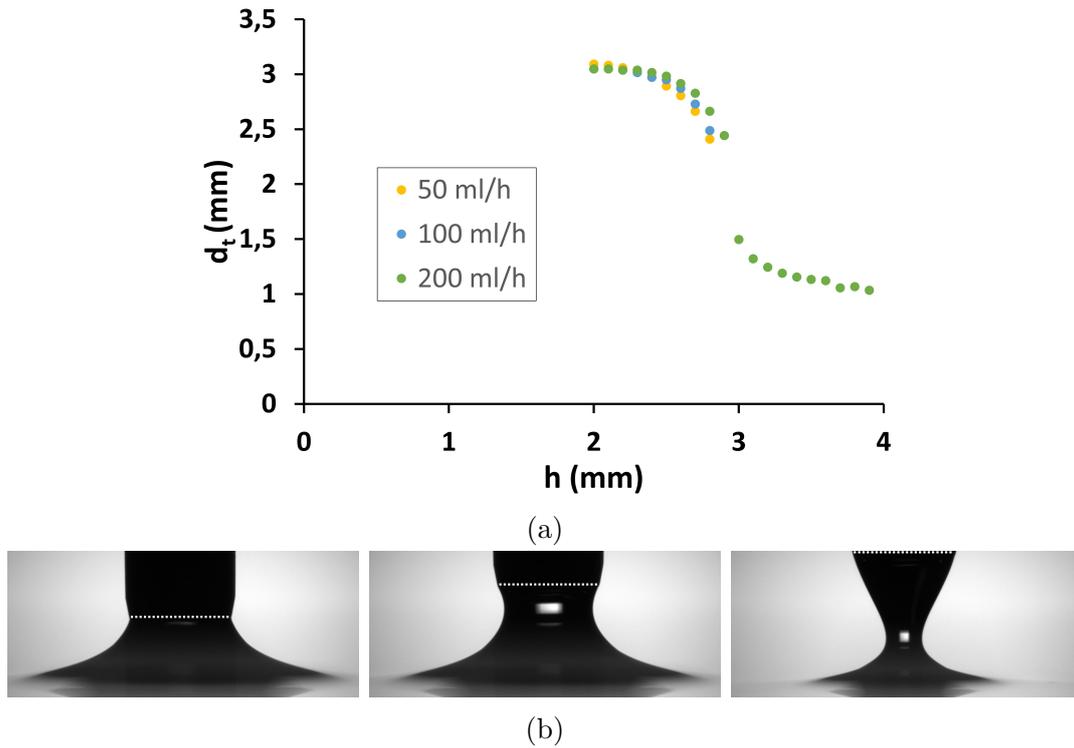


FIGURE 3.4.5 – Évolution (a) du diamètre du cou du ménisque ( $d_n$ ) en fonction de la hauteur de la buse d'extrusion ( $h$ ) à différents débits de co-extrusion à un ratio de débits de 1 et (c) des photographies du pont liquide pour une co-extrusion à un débit de  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$  à différentes hauteurs, de gauche à droite, les hauteurs sont 1,8, 2,8 et 3,8 mm. Le diamètre interne du tube externe de la buse est de 3 mm et le trait pointillé blanc indique la pointe de la buse.

de convertir nos tubes d'alginate en bioréacteur, nous avons à notre disposition des capillaires de verre ayant un diamètre externe de 1,8 mm. Par expérimentation, nous avons conclu qu'il était possible de brancher ces capillaires dans des tubes d'alginate ayant un diamètre se situant entre 1,7 mm et 1,5 mm. Pour un injecteur ayant un diamètre interne du tube externe de 3,3 mm, à une hauteur  $h = 3,3$  mm, le diamètre interne du tube après gélification complète ( $d_{f\_int}$ ) est de 1,6 mm (figure 3.4.6). Nous sélectionnons donc cette hauteur pour fabriquer des tubes d'alginate pouvant être utilisés pour la fabrication d'un bioréacteur qui sera détaillée en 4.2.2.2.

Par ailleurs, nous observons un drainage dans le cœur du tube d'alginate ayant une phase interne aqueuse non gélifiante. Ce phénomène est une conséquence du temps long nécessaire à la gélification complète de l'alginate. En effet, puisque nous maintenons les tubes à la verticale pendant 15 minutes, l'alginate qui n'est pas entièrement figé va couler sous l'effet de la gravité. Si nous prenons deux positions dans le tube d'alginate, une au fond de la cuve correspondant au début de l'extrusion du tube (figure 3.4.7b)

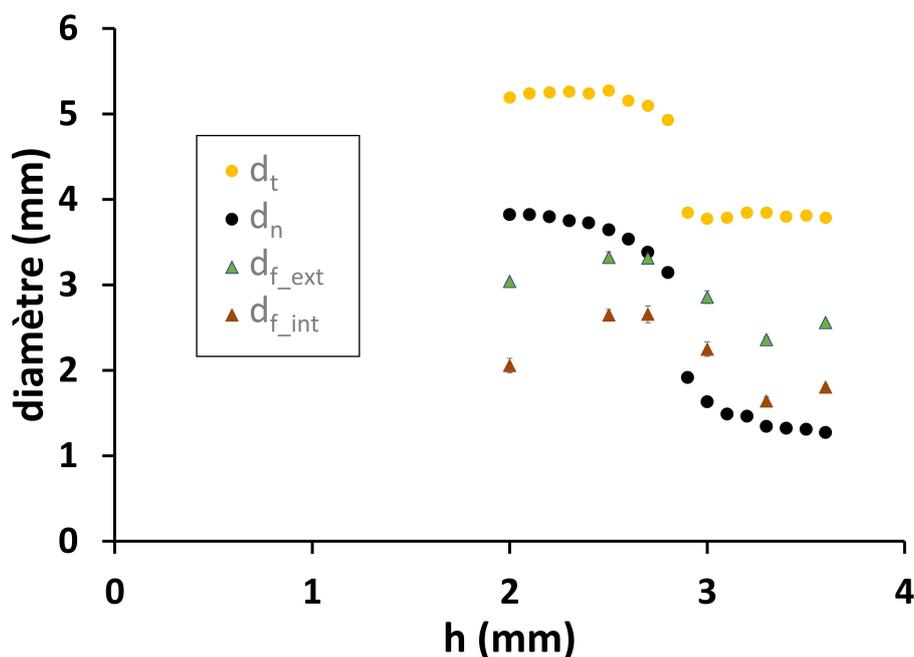


FIGURE 3.4.6 – Évolution du diamètre du cou du ménisque ( $d_n$ ), du diamètre du tube dans le bain ( $d_t$ ) et du diamètre externe ( $d_{f\_ext}$ ) et interne ( $d_{f\_int}$ ) du tube après gélification en fonction de la hauteur de la buse d'extrusion ( $h$ ) à un débit total  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$ . Une solution d'alginate et une solution de 2 % de glucose sont coextrudées, à un ratio de débit de 1, dans un bain de calcium à une concentration de 100 mM.

et une en haut (figure 3.4.7a) correspondant à la fin de l'extrusion du tube, nous observons que le tube est beaucoup plus net en fin d'extrusion et a des parois très fines par rapport à la partie du début d'extrusion où nous ne pouvons pas réellement distinguer l'interface interne.

### 3.4.2.1 Stabilisation de l'interface interne du tube

L'ajout de calcium dans la phase interne permet de figer l'alginate en créant un front de réticulation interne. Lorsqu'il n'y a pas de calcium dans la phase interne du tube, nous observons un hydrogel diffus, qui n'a pas de limites nettes 3.4.9a. En revanche lorsque l'on rajoute une concentration de 10 mM de calcium dans la phase interne, on observe que la limite interne du tube est beaucoup plus nette et on constate un flambage. Le flambage d'un cylindre à paroi fine et élastique a été étudié sur différents matériaux tels que la gomme de silicone, dans le cas d'une déformation sous son propre poids [74], ou le Melinex (un film de polyester), dans le cas d'une déformation par compression axiale (figure 3.4.8) [73]. De plus, dans des situations plus

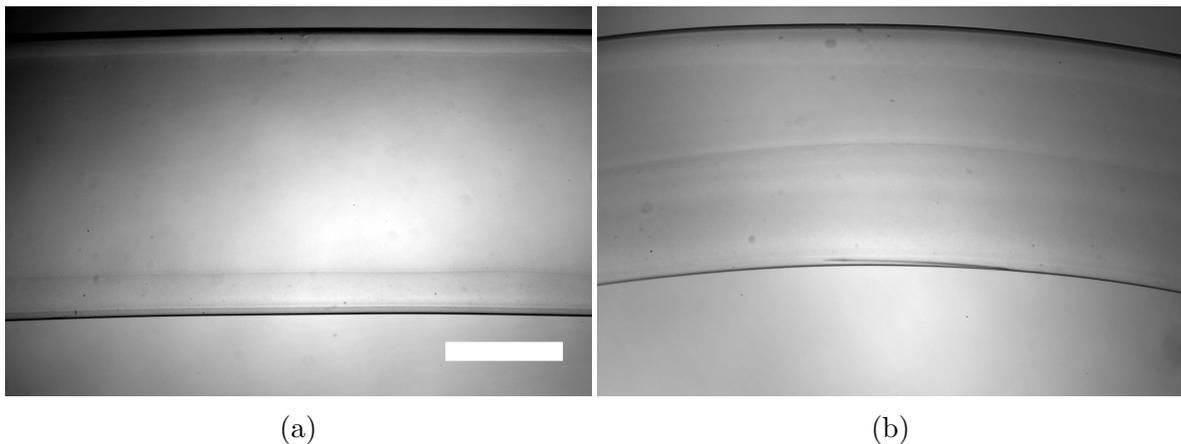


FIGURE 3.4.7 – Images obtenues par microscopie optique après une nuit de gélification de tronçons de 0,5 cm d'un tube d'alginate mesurant 24 cm de long à (a) 6 cm et à (b) 20 cm. La position à 0 cm correspond à la fin de l'extrusion, c'est-à-dire la partie située sur le haut de la cuve. La barre d'échelle représente 1 mm

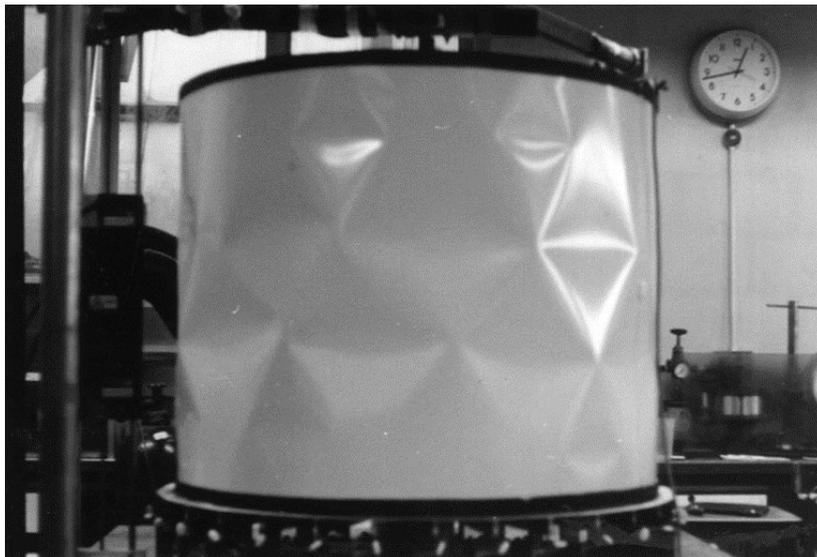


FIGURE 3.4.8 – Photographie d'une cylindre creux de Melinex après une compression axiale, à l'aide d'un disque monté sur la partie supérieure du cylindre, où environ la moitié de la circonférence est recouverte d'un motif plus ou moins régulier de creux [73].

complexes, l'apparition de rides sur une membrane élastique et leur morphologie sont influencées par la géométrie, l'existence d'une couche visqueuse, ou bien viscoélastique, sur laquelle repose la membrane [75]. Ainsi, la grande différence de rigidité entre la membrane interne formée par la faible concentration de calcium apportée et la couche visqueuse d'alginate non gélifiée peut causer le flambage de la phase interne du tube par écoulement sous son propre poids.

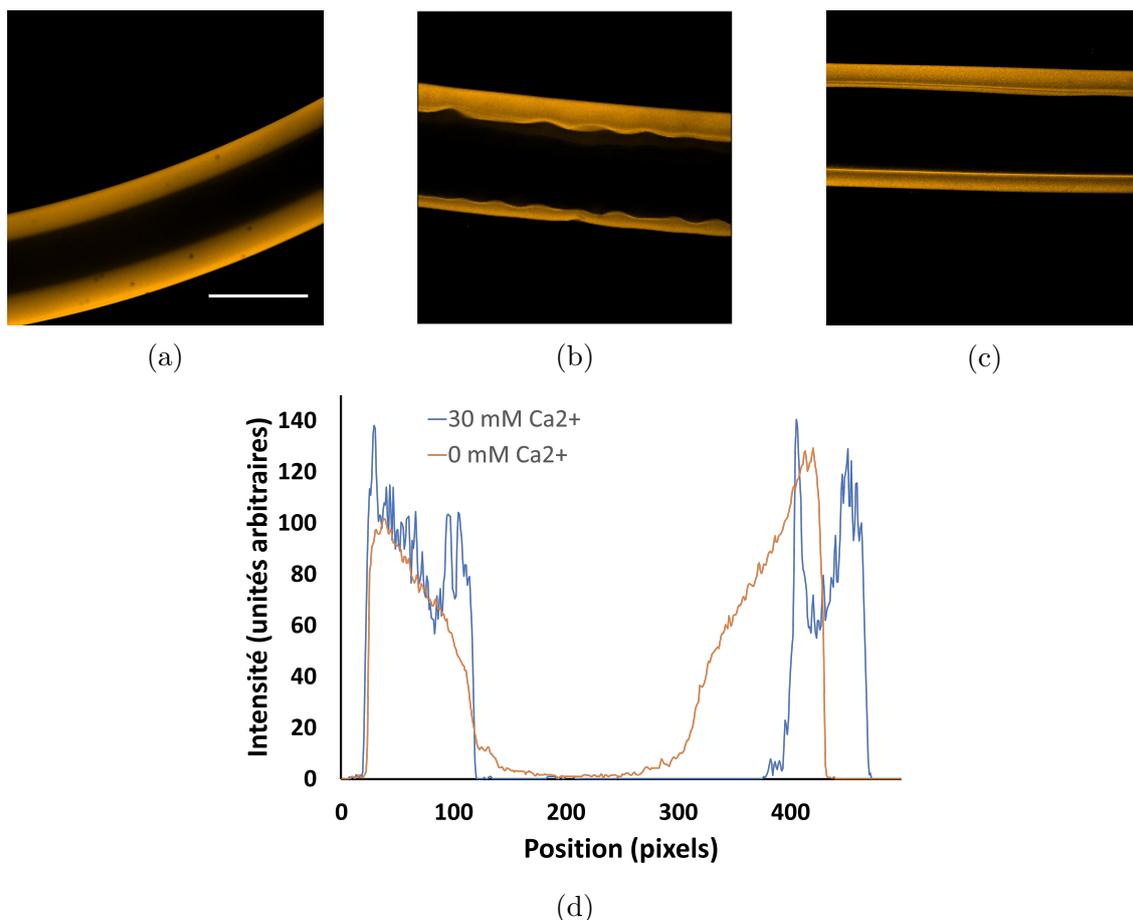


FIGURE 3.4.9 – Coupe équatoriale obtenue par microscopie confocale d’un tube d’alginate marqué à la rhodamine 6G à différentes concentrations de calcium dans la phase interne : (a) 0 mM, (b) 10 mM et (c) 30 mM. La figure (d) représente le profil d’intensité moyenne de la fluorescence en unités arbitraires sur une coupe transversale du tube avec ou sans calcium dans la phase interne. La barre d’échelle représente 2 mm.

En effet, on observe que le flambage disparaît lorsque l’on augmente la concentration de calcium dans le cœur à 30 mM. Le film mince est alors plus rigide, et la cinétique de gélification plus rapide. Ouwertx et al. ont montré que la rigidité d’une bille d’alginate, fabriquée à partir d’une solution d’alginate à 1,5% ayant une viscosité d’environ 0,77 Pa.s, augmente selon la concentration de la solution de calcium avant d’atteindre un plateau lorsque la concentration est de 75 mM [58]. On note que même s’il est nécessaire de gélifier le tube depuis l’intérieur, il faut néanmoins éviter la diffusion des ions calcium dans l’injecteur afin de ne pas provoquer son obstruction.

L’ajout de calcium dans le cœur du tube entraînera une conséquence sur la forme du ménisque et sa stabilité (figure 3.4.10a). En effet, lorsqu’il n’y a pas de calcium dans la phase interne, la rupture du pont liquide survient à une hauteur de 3,8 mm.

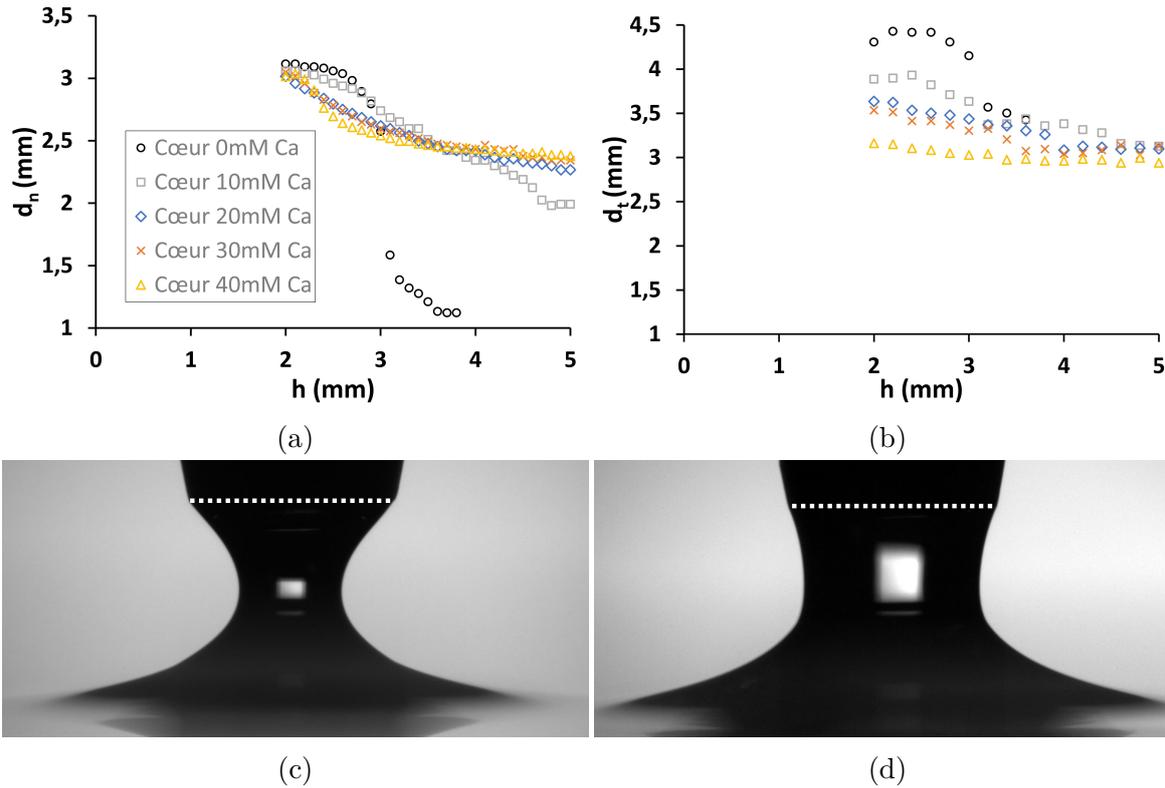


FIGURE 3.4.10 – Évolution (a) du diamètre du cou du ménisque ( $d_n$ ) et (b) du diamètre du tube dans le bain ( $d_t$ ) en fonction de la hauteur  $h$  à  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$ , pour différentes concentrations en calcium de la phase interne, et photographies du pont liquide formé par la co-extrusion dans un bain de calcium d'une phase externe d'alginate et une phase interne de glucose à 2% (c) sans ou avec (d) 30 mM de calcium. Le débit d'extrusion est  $q_{total} = 200 \text{ ml.h}^{-1}$ . Le trait en pointillés représente l'extrémité de l'injecteur qui se situe à  $h = 3 \text{ mm}$ .

Avec l'ajout de calcium, nous pouvons stabiliser le pont liquide sur une hauteur bien supérieure à 5 mm. L'effet de la présence de d'ions gélifiants dans la phase interne de la co-extrusion est concentration-dépendant et il sature à partir de 30 mM. Cela suggère qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter plus de 30 mM de calcium dans la phase interne. En effet, lorsque nous nous intéressons au diamètre du tube d'alginate dans le bain de calcium, nous remarquons que pour des hauteurs supérieures à 3,3 mm,  $d_t$  atteint une valeur plateau. Les tubes d'alginate obtenus par ce procédé ont un diamètre interne de 1,55 mm. Cette valeur reste compatible avec l'utilisation du capillaire en verre de 1,8 mm.

## 3.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'élaboration d'un système permettant la fabrication de tubes d'hydrogel à bas débit. La co-extrusion d'une phase externe de solution d'alginate et de phase interne de solution aqueuse dans un bain forme un pont liquide lorsque la goutte de fluide formée au niveau de la buse est stabilisée par la présence d'une surface libre à une hauteur suffisamment faible. Lorsque ce bain est composé d'eau, nous n'observons pas la formation d'un tube alors que si un agent gélifiant tel que le calcium est ajouté, un tube se forme. De plus, selon la hauteur d'extrusion, et donc le diamètre du cou du pont liquide, il est possible de moduler le diamètre externe du tube. Ces résultats suggèrent donc que la formation du tube résulte d'une compétition entre l'étalement de la solution d'alginate à la surface libre du bain et de la transition sol-gel induite par la diffusion des cations depuis le bain. Par ailleurs, si la solution interne ne contient pas ou une faible concentration de cations, nous observons une déstabilisation de l'interface interne du tube causant respectivement l'établissement d'un diamètre interne inhomogène ou un flambage. L'ajout d'une quantité de calcium permettant la gélification d'une couche suffisamment épaisse permet de pallier ce problème et la formation d'un tube ayant un diamètre externe observé dans le bain qui est celui de la buse d'extrusion.

Puisque ce tube d'alginate sera appliqué à la culture de bactéries, dans le chapitre suivant nous caractériserons les propriétés physico-chimiques de cet hydrogel. Nous nous intéresserons en particulier à la stabilité d'un tel tube dans des tampons biologiques.



# Chapitre 4

## Ajustement des propriétés de l'hydrogel

### 4.1 Introduction

Grâce au procédé décrit dans le chapitre précédent nous sommes capables de fabriquer des tubes d'hydrogel de diamètre calibré par coextrusion. Ces tubes d'alginate de calcium sont transparents, faisant d'eux un bon support d'observation microscopique en biologie. Nous pouvons les manipuler délicatement à la main gantée, mais aussi à l'aide de deux pinces tenues de part et d'autre du tube pour maintenir un environnement le plus proche possible de la stérilité. L'utilisation des pinces va écraser le tube de façon irréversible car l'alginate de calcium est un matériau plastique, mais il est possible de retirer les parties inutilisables et couper des tronçons de tubes de la longueur voulue à l'aide d'une paire de ciseaux à lames propres. Dans le chapitre qui suit, nous allons discuter des étapes nécessaires pour transformer ces tubes d'alginate en bioréacteur.

Il faut tout d'abord mettre en place un protocole pour raccorder le tube d'alginate à un système permettant de le perfuser et minimiser la manipulation directe de l'hydrogel. Cette connexion doit être suffisamment robuste pour perfuser le tube d'alginate de façon hermétique. Dans un second temps, la stabilité de l'hydrogel dans les milieux de culture bactériens, contenant de nombreux ions nécessaires à la survie des bactéries, sera étudiée. En effet, des ions tels que le sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) peuvent causer la dissolution de l'hydrogel d'alginate de calcium. Le système final doit être stérile et étanche afin de garantir une culture de quelques jours sans contamination.

## 4.2 Perfuser un tube d'alginate

Les tubes d'hydrogel sont composés majoritairement d'eau, à plus de 97% d'eau, ils sont donc très mous et difficiles à manipuler sans les déformer ou les déchirer. Il nous faut donc une solution pour pouvoir manier les tubes facilement d'une façon la plus stérile possible, afin de pouvoir raccorder les tubes à un système en flux pour une application biologique. Nous avons fait le choix de raccorder nos tubes d'alginate à des capillaires en verre car ils sont transparents et biocompatibles. De plus, la chimie de surface du verre est bien connue et il existe de nombreux traitements possibles pour fonctionnaliser ce matériau.

Notre tube étant destiné à de la culture cellulaire, nous devons trouver une solution biocompatible pour assembler l'hydrogel au capillaire en verre. Nous envisageons dans un premier temps de simplement brancher le tube d'alginate sur un capillaire ayant un diamètre légèrement plus grand que celui du tube, aussi appelé ajustement serré. Ce raccord par compression est possible sur un court temps mais due à la viscoélasticité du matériau [76], les contraintes élastiques relaxent et une telle jonction ne sera donc pas suffisante pour éviter les fuites : lorsque le tube est perfusé, il glisse et se détache du capillaire. Dolati et al. ont proposé d'attacher leurs tubes d'alginate à des aiguilles à l'aide de pinces chirurgicales [77] afin de perfuser des tubes à base d'hydrogel d'alginate, pendant une heure. Leurs tubes qui ont été extrudés à partir d'une solution d'alginate de 3-4 % m/v possèdent un module d'Young d'environ 160 kPa. Leslie Rolland, dans ses travaux de thèse, a montré qu'une solution d'alginate à 2% m/v permettait d'obtenir un gel avec un module d'environ 70 kPa et un seuil de plasticité de l'ordre de 8% [55]. La membrane obtenue par Dolati et collaborateurs est donc plus résistante et ils ont pu obtenir une telle étanchéité car les temps caractéristiques de relaxation des contraintes augmentent avec la quantité d'alginate [76].

La déformation d'un matériau est associée à un module élastique (ou module de Young), caractéristique de la résistance aux contraintes faibles. Lorsque la contrainte appliquée dépasse le seuil d'élasticité du matériau, celui-ci se déforme de manière irréversible : c'est la déformation plastique. La réponse d'un gel à une contrainte dépend fortement de sa nature. Dans le cas de l'alginate, si le gel est d'origine chimique (covalente), les nœuds de réticulation ne peuvent pas être défaites. De ce fait, le réseau ne subit qu'une déformation élastique due au déplacement de l'eau, on parle alors de poro-élasticité. Cependant, si le gel est de nature physique (ionique), les nœuds se cassent et se reforment : les ions calcium se détachent de la chaîne d'alginate, migrent avec le flux d'eau déplacé lors de la déformation puis se complexent de nouveau avec l'alginate, plus loin [78], le gel est ainsi qualifié de viscoélastique. Le réseau a alors

subi une déformation irréversible qui est aussi appelé phénomène de "unzipping".

La fixation mécanique du tube étant impossible du fait de sa fragilité, la solution était donc de trouver une "colle" pour que le tube adhère sur le capillaire. L'adhésion d'un objet sur l'autre résulte d'une interaction de nature covalente ou physique entre les deux objets. Dans le cas d'un hydrogel, l'adhésion est difficile car c'est un matériau fortement hydraté et déformable qui ne possède que peu de groupements fonctionnels. L'alginate possède des fonctions carboxyles ( $R-COOH$ ,  $pka \approx 4,5$ ) qui sont chargées négativement à pH 7, pH neutre auquel nous travaillons (figure 4.2.1a). C'est grâce à cette charge que les carboxylates ( $R-COO^-$ ) sont capables de complexer les cations divalents par un modèle que nous détaillerons en 4.3.

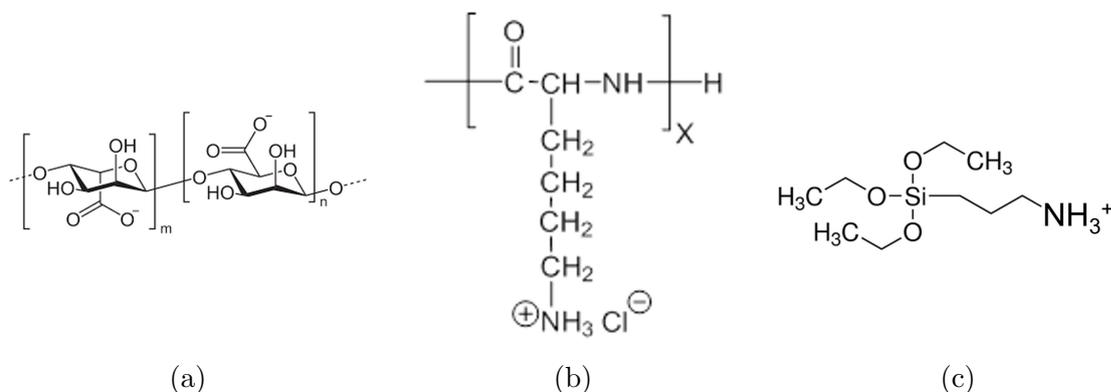


FIGURE 4.2.1 – Représentation des molécules (a) d'alginate, (b) de poly-L-lysine (PLL) et (c) de (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES)

L'adhésion covalente de l'alginate sur une surface ne peut se faire que par la fonctionnalisation de son groupe carboxyle. Cette fonctionnalisation en milieu aqueux nécessite une catalyse acide ( $pH \approx 4-5$ ) car sous sa forme déprotonée, l'ion carboxylate est fortement stabilisé par résonance, ce qui le rend très peu réactif. Cette approche pose néanmoins un problème car l'efficacité d'une telle fonctionnalisation est de l'ordre de 5%, donc très faible [79].

Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation d'une "colle" électrostatique interagissant uniquement avec la surface du tube. Dans l'hydrogel d'alginate, les fonctions carboxylates présentes à sa surface lui confèrent une charge de surface négative. Par ailleurs, il existe des molécules communément utilisées en biologie pour charger positivement une surface en verre : la poly-l-lysine et l'amino-silane. Tous deux possèdent des fonctions amine primaire (figures 4.2.1c et 4.2.1b) ( $R-NH_2$ ,  $pka \approx 9,5$ ) qui, à pH neutre, sont positivement chargées ( $R-NH_3^+$ ). L'interaction électrostatique entre la surface chargée positivement du verre traité et la surface négativement chargée de l'alginate permettra l'adhésion entre les deux.

Dans un premier temps, nous avons fait le choix de travailler avec des billes d'alginate aplaties, les rendant ainsi plus simples à manipuler et permettant l'étude de l'adhésion au verre tout en gardant le même matériau. Ces expériences détermineront donc les conditions adéquates qui seront par la suite appliquées aux tubes d'alginate.

## 4.2.1 Matériel et méthodes

### 4.2.1.1 Adhésion d'une bille d'alginate sur une lame de verre

#### 4.2.1.1.1 Préparation des lames de verre

Des lames de verre (25 mm x 70 mm) sont coupées en deux, puis nettoyées à l'eau ultra-pure, à l'acétone puis à l'éthanol et séchées à l'étuve à 65 °C. Ces lames sont ensuite traitées au plasma à oxygène (Diener Femto) pour les nettoyer et activer leur surface (60 % de la puissance maximale, 0,6 bar de pression, 15 minutes), puis tout de suite traitées selon un des protocoles suivants :

- Poly-L-lysine 0,03 % final v/v dans de l'eau ultra-pure (0,1 %, MW=150,000-300,000, Sigma-Aldrich) : Les lames sont immergées pendant 2h30 sous agitation orbitale, puis séchées à l'air comprimé et rincées à l'eau ultra-pure juste avant utilisation. Elles doivent être utilisées dans le mois qui suit la préparation car nous avons observé qu'au-delà, le traitement de surface n'est plus aussi efficace.
- (3-Aminopropyl)triéthoxysilane 2 % v/v final dans de l'éthanol (APTES, Sigma-Aldrich) : Les lames sont immergées pendant une minute sous agitation, puis rincées à l'acétone, à l'éthanol puis à l'eau avant un séchage rapide à l'air comprimé.

Les lames de verre sont ensuite conservées au sec et à température ambiante. L'efficacité du traitement de surface a été quantifiée par mesure d'angle de contact.

#### 4.2.1.1.2 Préparation des billes d'alginate

Des billes d'hydrogel sont formées par goutte à goutte d'une solution d'alginate de sodium à 1,6% m/m à travers d'une buse d'extrusion, composée d'une aiguille de diamètre externe 1,83 mm (Olive, Optimum®, Nordson), placée à 15 cm de la surface libre du bain de calcium, avec un débit de 10 ml.h<sup>-1</sup>. Ces conditions expérimentales nous permettent d'obtenir des gouttes d'alginate d'un volume de 3,1.10<sup>-2</sup> ml, déduit de la pesée, soit d'un diamètre de 3,9 mm, qui tombent ensuite dans une solution de gélification composée soit de chlorure de calcium à une concentration de 100 mM (anhydre,

pureté  $\geq 93$  %, Sigma-Aldrich), soit de chlorure de baryum à une concentration de 40 mM ou 100 mM (pureté  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich). Après deux heures de gélification dans le bécher, les billes sont rincées puis transférées dans une bouteille contenant un très grand volume d'eau ultra-pure. Cette étape de dialyse d'environ 20 h va nous permettre de retirer tous les cations divalents non complexés par l'alginate. Les billes sont ensuite placées dans différentes conditions expérimentales, sans agitation.

#### 4.2.1.1.3 Protocole d'adhésion d'une bille d'alginate sur une lame de verre

Afin d'augmenter la surface de contact avec le verre, les billes d'alginate sont ensuite aplaties. Les billes sont placées sur une lame de verre sur laquelle on a déposé deux bandes de lame de verre servant de tasseau afin de maintenir une hauteur uniforme. On place ensuite une lame de verre par-dessus et on appuie pendant 30 secondes (4.2.2a). L'alginate étant un matériau plastique, les billes ainsi aplaties sont déformées de façon permanente, et maintiennent leur forme de galette.

Les galettes d'alginate sont ensuite déposées sur les lames de verre traitées, et leur adhésion est testée en appliquant un jet d'eau à l'aide d'une pissette d'eau ultra-pure. Si les billes ne se décolent pas au jet, les lames sont placées dans des conditions mimant la culture, à 37 °C pendant une nuit, puis l'adhésion est de nouveau testée par application de jet d'eau.

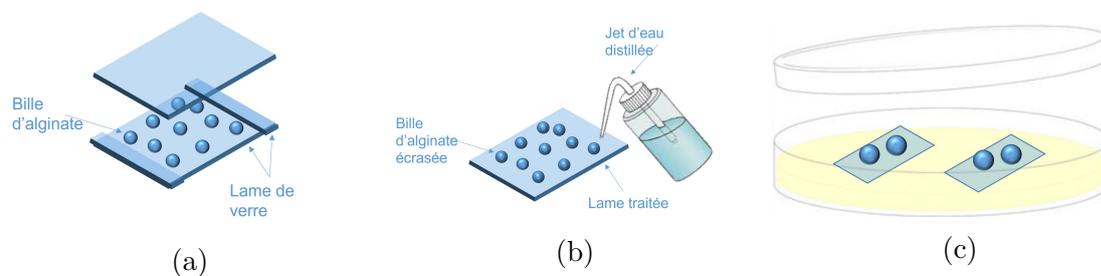


FIGURE 4.2.2 – Schéma du protocole de préparation des billes d'alginate. Les billes sont d'abord (a) aplaties en galettes puis déposées sur des lames de verre, (b) leur collage est testé à l'aide d'un jet d'eau et (c) les lames sont déposées dans différentes solutions à 37°C pour une nuit

#### 4.2.1.2 Adhésion d'un tube d'alginate sur un capillaire en verre

##### 4.2.1.2.1 Préparation des capillaires de verre

Des capillaires en verre (DE= 1,8 mm et DI= 1,5 mm, VitroCom) sont coupés pour obtenir des tronçons de 3 cm. L'embout des capillaires est ensuite placé au centre de la bobine de résistance d'une étireuse à capillaires (PC-10, Narishige, appareil de production de micropipettes en verre par étirement) et chauffé à température maximale pendant 25 secondes. Cette étape permet de polir le site de découpe et rétrécir légèrement la pointe pour pouvoir l'enfiler plus facilement dans le tube d'alginate sans le déchirer. Afin d'empêcher la fonctionnalisation de l'intérieur des capillaires, une de leur extrémité est obstruée : le capillaire est d'abord emmanché dans un tronçon d'1,5 cm de tube flexible en silicone (DE= 2,5 mm et DI= 0,8 mm, BioChem Fluidics) qui est ensuite bouché à l'aide d'une pince de Mohr. En effet, cela permettra de piéger de l'air dans le capillaire lors de son immersion dans les solutions de poly-L-lysine ou d'amino-silane. Ils sont ensuite nettoyés et traités en suivant le même protocole que les lames de verre.

#### 4.2.1.2.2 Préparation des tubes d'alginate

Les tubes d'alginate sont fabriqués selon le protocole décrit dans le chapitre précédent avec les conditions suivantes :

- La phase externe composée de 1,6 % m/m alginate est extrudée à un débit de 100 ml.h<sup>-1</sup> à partir d'un cylindre ayant un diamètre interne de 3 mm et un diamètre externe de 3,06 mm.
- La phase interne composée de 2 % m/m glucose et 30 mM CaCl<sub>2</sub> est extrudée à un débit de 100 ml.h<sup>-1</sup> à travers une aiguille ayant un diamètre interne de 1,54 mm et un diamètre externe de 1,83 mm.
- Bain gélifiant composé de 100 mM CaCl<sub>2</sub> dont la surface libre se trouve à 3,3 mm de l'extrémité la buse

Les tubes, fabriqués dans des conditions propres mais non stériles, sont maintenus à la verticale dans le bain pendant 15 minutes après extrusion, jusqu'à gélification complète de l'hydrogel (partie 3.2.2). Puis ils sont conservés dans une boîte de pétri, immergés dans une solution stérile de calcium à 100 mM, à 4 °C et utilisés sous 24h.

Contrairement aux billes, les tubes que l'on veut coller ne sont pas dialysés car l'excès d'ions calcium en solution permet de créer un écran entre le verre traité et l'alginate, ce qui permet de faciliter l'insertion du capillaire en verre dans le tube. Le système est dialysé par la suite dans de l'eau ultra-pure, ce qui déclenche le collage entre le tube d'hydrogel et le capillaire en verre.

### 4.2.1.2.3 Protocole d'adhésion d'un tube d'alginate sur un capillaire en verre

Le tube d'alginate et le capillaire sont déposés dans une boîte de pétri contenant une solution de calcium. Le capillaire est inséré dans le tube d'alginate à l'aide de pinces en plastique à bout rond puis la solution de calcium est retirée par aspiration. Le système est rincé avec de l'eau ultra-pure, avant d'être dialysé pendant 30 minutes sans agitation, puis rincé de nouveau. Les capillaires en verre peuvent être insérés dans un morceau de tube flexible en silicone en vue de la perfusion des tubes d'alginate.

## 4.2.2 Résultats et discussion

### 4.2.2.1 Étude de l'adhésion d'une bille d'alginate sur une lame de verre

#### 4.2.2.1.1 Fonctionnalisation de la surface par l'amino-silane

Les silanes sont des molécules largement utilisées pour la fonctionnalisation du verre. Ils forment une liaison covalente avec le groupe hydroxyle à la surface du verre activé et peuvent être greffés avec de nombreux groupements fonctionnels. Le dépôt de silane sur le verre peut se faire soit en phase vapeur, soit en phase liquide. Dans cette étude, nous fonctionnalisons nos lames en phase liquide par un amino-silane (APTES) qui possède trois potentiels points d'ancrage (figure 4.2.3). Un greffage covalent est efficace dans les conditions de culture bactérienne car il ne sera pas affecté par la force ionique, puisque comme son nom l'indique, ce greffage est irréversible.

Lorsque nous déposons les galettes d'alginate sur des lames de verre fraîchement traitées, nous observons une adsorption immédiate. Cette adhésion est mise à l'épreuve par un jet d'eau : aucune bille ne se décolle. Les lames de verre sont ensuite placées dans une boîte de pétri remplie d'eau ultra-pure puis : soit laissées à température ambiante, soit placées à 37°C pour mimer la culture bactérienne. Après une nuit, dans les deux conditions, nous remarquons que les galettes d'alginate se sont décollées des lames de verre.

Nous nous intéressons donc à l'efficacité de la fonctionnalisation des lames de verre. À l'aide d'un tensiomètre, nous mesurons l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la lame de verre. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.1. La lame de verre native étant très hydrophile, sa fonctionnalisation par l'APTES, contenant des chaînes carbonées, va lui conférer un caractère moins hydrophile : nous nous attendons donc à une augmentation de l'angle de contact due à une diminution de la mouillabilité du verre. En effet, l'angle de contact mesuré sur une lame de verre native est de 15,8°

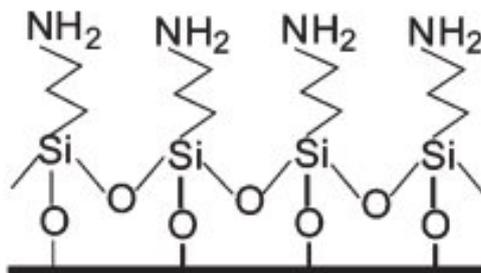


FIGURE 4.2.3 – Représentation du greffage idéal de l'APTES au verre à  $\text{pH}=10 > \text{pK}_{\text{a}}(\text{NH}_3^+/\text{NH}_2)$  [80]

alors qu'il est de  $60,8^\circ$  sur une lame de verre fraîchement greffée d'APTES. Cependant, nous remarquons que dès lors que la lame entre en contact avec de l'eau, l'angle de contact diminue jusqu'à atteindre la même valeur que celle de la lame de verre native. L'effet du traitement de surface semble avoir complètement disparu après une nuit en milieu aqueux.

Zhang et collaborateurs ont étudié la stabilité d'une déposition de différentes amino-silanes par phase vapeur. La désorption de l'APTES serait due à l'hydrolyse de la liaison Si-O et en particulier son auto-hydrolyse par une attaque nucléophile de son amine [80]. Afin de s'affranchir de cette hydrolyse, ils proposent l'utilisation de la 3-Aminopropyldiisopropylethoxysilane (APDIPES) qui, grâce à ses deux isopropyls permet de créer une gêne stérique autour de l'atome de silicone afin de le protéger de l'hydrolyse. Cependant, cette solution, bien qu'offrant une fonctionnalisation plus résistante, n'est pas entièrement efficace lorsque les surfaces silanisées sont immergées longtemps en milieu aqueux. Nous nous concentrons donc sur la poly-L-lysine, qui, malgré le lien non-covalent formé avec le verre, reste très utilisée pour les traitements de surface en biologie.

Condition	Angle de contact ( $^\circ$ )
Lame de verre native	15,8
Lame de verre traitée APTES	60,8
Lame de verre traitée APTES dans eau	31,6
Lame de verre traitée APTES dans eau 24h	15,4
Lame de verre traitée Poly-L-lysine	16,72

TABLE 4.1 – Mesure de l'angle de contact avec une goutte d'eau d'une lame de verre traitée ou non

#### 4.2.2.1.2 Fonctionnalisation de la surface par la poly-L-lysine

La poly-L-lysine (PLL) est un poly-électrolyte chargé positivement à pH neutre qui est utilisé en biologie depuis 1972 [81] en tant que traitement de surface pour promouvoir l'attachement de cellules ou particules possédant une charge de surface négative. Pour cette application, le temps de traitement va d'une minute à plusieurs heures et la concentration se situe entre 0,001 % et 0,1 % m/v [82]. L'efficacité du traitement de surface par des poly-électrolytes étant gouvernée par les interactions électrostatiques il dépend de beaucoup de facteurs tels que la chimie de surface du substrat, le pH, la force ionique, la température. Selon l'étude de Choi et collaborateurs [83], pour nos conditions expérimentales, les conditions optimales pour l'adsorption de la PLL au verre seraient à pH 8. Cette condition nous permettra d'obtenir une couche fine, rigide et homogène de PLL.

Après avoir testé différentes concentrations et différents temps de traitements, nous avons déterminé que, pour notre application, la concentration optimale est de 0,03 % m/v et le temps d'incubation de 2h30. Dans ces conditions, les galettes d'alginate de calcium, préalablement dialysées pour retirer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  en excès sont immédiatement adsorbées sur les lames de verre traitées. Un jet d'eau est alors appliqué à l'aide d'une pissette : aucune des billes ne se décolle du support. Les galettes d'alginate collées sur les lames de verre sont ensuite déposées dans différentes solutions pendant 24 heures à 37°C pour mimer la culture bactérienne, puis un jet d'eau est appliqué aux billes collées. Les résultats sont représentés dans le tableau 4.2.

Lame de verre	Billes collées (0h)	Condition	Billes collées (24h)
Native	0%	-	-
PLL	100%	Eau	100%
PLL	100%	10 0mM CaCl2	100%
PLL	100%	Milieu LB	0%

TABLE 4.2 – Test de décollement des billes d'alginate après 24h d'incubation à 37°C, les résultats indiqués sont ceux après l'application d'un jet d'eau.

Nous observons que les galettes d'alginate restent collées après 24h lorsque les lames sont immergées dans de l'eau ou dans une solution de calcium à une concentration de 100 mM (solution de gélification). En revanche, nous remarquons que 70% les galettes d'alginate collées sur les lames immergées dans le milieu LB (milieu riche de culture bactérienne, formule en 5.2.1.1) sont décollées après 24h, et les 30% restantes sont décollées avec le jet d'eau. En observant ces lames de verre de plus près, nous remarquons des résidus d'hydrogel qui ne se décollent pas avec un jet d'eau. Cela

suggère que la poly-L-lysine est une bonne "colle", même dans des conditions de salinité compatibles avec une culture bactérienne (170 mM de chlorure de sodium (NaCl)). Par ailleurs, nous observons que le volume des galettes d'alginate immergées dans le milieu LB a augmenté et le décollage des galettes semble être dû à ce gonflement. Lorsque les galettes d'alginate sont placées dans de l'eau pure ou dans la solution de calcium, l'hydrogel ne se dissout pas. Le système est donc dans un état thermodynamique stable et l'énergie nécessaire à la dissociation du complexe est trop élevée. Cependant, lorsqu'elles sont incubées dans du milieu de culture contenant des sels de sodium, les galettes gonflent. Au cours de ses travaux de thèse, Leslie Rolland a montré que la force ionique permet d'augmenter la constante de dissociation du gel [55].

La dissolution de l'hydrogel est décrite par le phénomène de "unzipping" qui se propage lorsque l'alginate de calcium est plongé dans une solution saline [84]. En effet, les ions  $\text{Na}^+$  peuvent s'échanger avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  : les ions sodium remplacent les ions calcium dans la structure de boîte à œuf, ce qui a pour conséquence l'éloignement progressif des chaînes et le déplacement des nœuds de réticulation. Dans ce processus, la contribution de l'ion sodium est majoritairement entropique. Lorsque les ions sodium sont en large excès par rapport aux ions calcium, au bout d'un certain temps, l'hydrogel sera dissous. Nous observons ici un gonflement de l'hydrogel, et non une dissolution, car notre système n'est pas sous agitation : les galettes d'alginate ne sont donc pas dans un réservoir homogène ou infini et il reste une concentration locale de cations divalents suffisante pour maintenir un hydrogel très peu réticulé. Il serait donc possible de diminuer le gonflement de l'hydrogel en diminuant la quantité relative de sodium par rapport au calcium.

Cependant, une quantité minimale de 150 mM de NaCl est nécessaire à la croissance cellulaire : c'est une concentration dite physiologique, ou isotonique, qui possède la même osmolarité que le milieu intra-cellulaire. Bien que les bactéries à gram négatif telles que *E. coli* ou *S. typhi* possèdent une paroi cellulaire et une capsule en plus de la membrane cellulaire pour les protéger des stress environnementaux, elles ont un meilleur taux de croissance dans des conditions isotoniques car elles ne sont pas soumises à un stress osmotique [85]. Puisque nous ne pouvons pas diminuer la quantité d'ions sodium dans le milieu de culture, nous devons augmenter la quantité de calcium disponible en solution. Nous rajoutons donc du calcium à 2mM dans le milieu de culture. Cette concentration est celle qui est retrouvée dans le milieu de culture cellulaire Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) qui a été utilisé précédemment par Wafa Bouhleb, au cours de ses travaux de thèse, au laboratoire pour la culture de cellules humaines cancéreuses du colon (Caco-2) en capsules d'alginate [27]. Les capsules d'alginate incubées dans ce milieu de culture maintenaient leur état

de réticulation.

#### 4.2.2.2 Étude de l'adhésion d'un tube d'alginate sur un capillaire en verre

##### 4.2.2.2.1 Expérience dans de l'eau

Nous nous intéressons maintenant au collage des tubes d'alginate sur des capillaires en verre. Une fois que le tube d'alginate est collé sur un capillaire en verre qui lui-même est branché à un tube flexible en silicone servant de connecteur, le montage est rincé à l'eau ultra-pure. Le système est immergé pendant une nuit sans agitation, puis l'efficacité du collage est testée par l'injection manuelle d'une solution colorée à l'aide d'une seringue. Nous utilisons deux colorants différents : l'amarante (figure 4.2.4a) qui est une petite molécule capable de diffuser à travers les pores de l'hydrogel et le noir de carbone, un pigment noir utilisé dans les beaux-arts, qui est une microparticule qui ne peut pas traverser la membrane (figure 4.2.4b). Grâce à l'injection de la solution de noir de carbone dont la taille est supérieure à 20 nm (taille des pores de l'hydrogel d'alginate à 2% [30]), nous observons qu'il n'y a pas de fuite de liquide au niveau de la connexion entre l'alginate et le verre (indiquée d'un trait bleu sur la figure 4.2.4b).

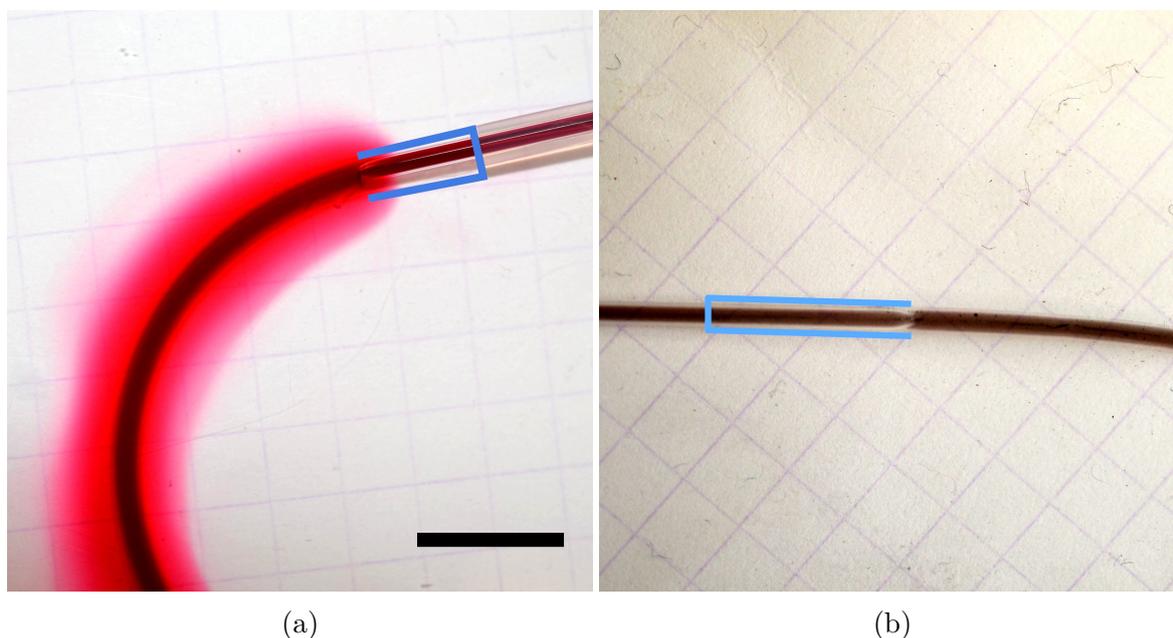


FIGURE 4.2.4 – Tubes d'alginate perfusés avec une solution colorée à l'amarante (a) et au noir de carbone (b). Les traits bleus indiquent les limites du tube d'alginate. La barre d'échelle équivaut à 1 cm.

Ensuite, la résistance mécanique du collage a été testée en bouchant un côté du tube et en appliquant une pression de l'autre côté à l'aide d'un contrôleur de pression.

Une solution de noir de charbon dispersé est injectée pour révéler d'éventuelles fuites (figure 4.2.5b). Bien que le tube gonfle, du fait de la mise sous pression (figure 4.2.5c), le collage est capable de résister à une pression de plus de 1,3 bar lorsque le tube est placé dans de l'eau ultra-pure. Nous décidons alors de mettre notre système à l'épreuve de la culture bactérienne.

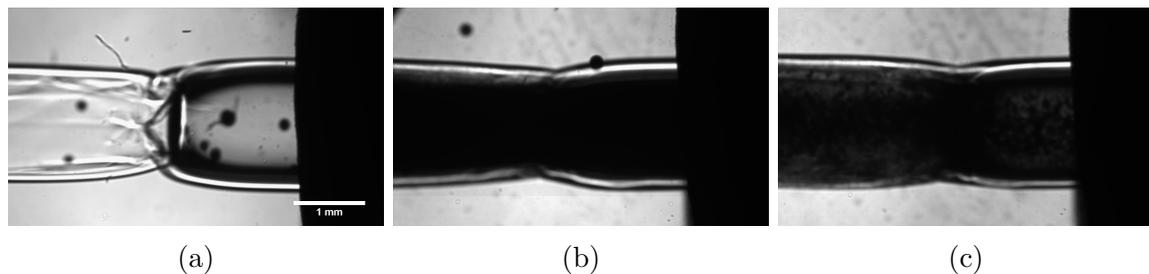
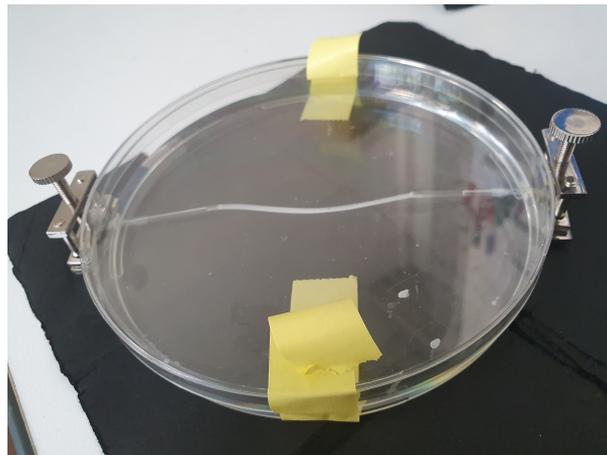


FIGURE 4.2.5 – Images obtenues par microscopie optique d'un tube d'alginate collé à un capillaire en verre (a) avant perfusion et bouchage, (b) après remplissage du tube et bouchage (pression = 0 bar) et (c) après mise sous pression du tube (pression = 1 bar)

#### 4.2.2.2 Expérience préliminaire de culture

Afin de vérifier la compatibilité du tube d'alginate collé sur un capillaire en verre fonctionnalisé à la poly-L-lysine, un système simple permettant la perfusion du tube d'alginate et la création de deux compartiments interne et externe au tube d'alginate a été mis en place. Ce bioréacteur consiste en un tube d'alginate collé sur deux capillaires en verre qui est fixé, à l'aide de tubes flexibles en silicone, dans une boîte de pétri de 150 mm de diamètre percée de part et d'autre afin de pouvoir perfuser le tube d'alginate sans contaminer le milieu externe. La boîte de pétri est d'abord remplie avec du milieu de culture LB supplémenté de 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  puis une solution de bactéries *E. coli* à une densité optique  $\text{DO}_{600}=0,3$  (soit  $2,4 \cdot 10^8$  bactéries par millilitre) est injectée dans le tube d'alginate. Le tube d'alginate est ensuite bouché de part et d'autre en pinçant les tubes flexibles (figure 4.2.6). Cette première expérience de biologie a pour but de vérifier la durabilité du collage à base de poly-L-lysine en condition de culture bactérienne car, si le collage n'est pas stable dans le temps une turbidité, conséquence de la croissance de bactéries provenant d'une fuite, sera observée dans le milieu de culture présent dans le compartiment externe.

Nous observons après une nuit de culture à  $37^\circ\text{C}$ , que le tube d'alginate s'est détaché des capillaires de verre, malgré la présence d'ions calcium dans le milieu de culture.

FIGURE 4.2.6 – Tube d'alginate ensemencé,  $t=0j$ 

Les résultats de cette expérience préliminaire montrent que l'alginate de calcium n'est pas le matériau le plus adapté à notre application. Il est donc nécessaire de modifier la formulation de l'hydrogel afin de créer de plus forts liens entre les chaînes d'alginate.

### 4.2.3 Conclusions

Grâce à cette étude, nous retenons que dans de l'eau ultra-pure, la poly-L-lysine permet un "collage" efficace de l'hydrogel au verre. Cependant, lorsqu'il est placé dans du milieu de culture, le tube d'alginate de calcium gonfle jusqu'à se dissoudre, soulevant donc la nécessité de changer la formulation de l'hydrogel, afin de créer un réseau plus résistant. De plus, pour prévenir le gonflement de l'hydrogel, il faut maintenir la concentration en ions sodium au minimum nécessaire à la croissance bactérienne, c'est-à-dire 150 mM. Le milieu LB étant un milieu prêt à l'emploi, il n'est pas facile d'en modifier la composition, et ainsi, le milieu qui sera utilisé pour la suite des expériences est le M9 dont la formule est donnée en 5.2.1.1). C'est un milieu synthétique à base de sels, ce qui nous permet de mieux en contrôler la composition.

## 4.3 Re-formulation de l'hydrogel

Nous avons vu dans la partie précédente que la présence des ions sodium peut provoquer la décomplexation des ions calcium de l'alginate si le système est très dilué. En étudiant le gonflement de billes d'alginate de calcium dans une solution de tampon physiologique (PBS), Bajpai et Sharma ont montré que cet échange ionique est contrôlé par la diffusion des ions[86]. Le but de cette thèse étant de créer un bio-réacteur à base d'hydrogel, il faut que notre hydrogel soit stable dans des conditions

physiologiques. Puisque nous ne pouvons pas modifier les concentrations en sel, nous ne pourrions prévenir entièrement le gonflement. Par conséquent, nous devons adapter la formulation de l'hydrogel. Il existe plusieurs solutions pour renforcer l'hydrogel d'alginate de façon biocompatible.

Une première possibilité serait de réticuler chimiquement l'alginate. En 2013, Lee et al. ont proposé une méthode pour la synthèse d'alginate-catéchol par la conjugaison de la dopamine, une catécholamine, à l'alginate via les fonctions carboxyles. Le conjugué alginate-catéchol est ensuite réticulé en présence d'un agent oxydant, formant un gel permanent de couleur marron au bout de 3 à 4 minutes [79]. La cinétique de réticulation de cet alginate fonctionnalisé n'est malheureusement pas compatible avec notre méthode de production de tubes d'alginate car cette dernière repose sur la gélification immédiate de l'alginate en présence de calcium. De plus, l'efficacité de greffage des catéchols étant d'environ 5%, il n'existe que peu de points de réticulation possible : l'hydrogel obtenu sera très mou.

La solution que nous avons retenue est de travailler avec un cation métallique ayant une affinité supérieure à l'alginate que le calcium. L'affinité d'un alginate pour un certain cation divalent dépend de sa composition en monomères M ou G. Ainsi, plus un cation aura une forte affinité pour l'alginate, plus la contraction lors de la formation de l'hydrogel sera forte. Les différents cations divalents ont pu ainsi être classés [87] :

- par ordre d'affinité décroissante pour l'alginate riche en acides guluroniques :  
 $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$
- et par ordre croissant de concentration nécessaire à la formation d'un gel :  
 $\text{Ba}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Mn}^{2+},$   
 $\text{Fe}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$

Le calcium n'est pas le meilleur ion dans aucun des deux classements. Par ailleurs, dans leurs travaux de thèse, Léopold Mottet et Bettina Roellinger se sont intéressés à la formation de billes d'alginate de baryum pour la fabrication de bio-piles. L'hydrogel d'alginate de baryum reste stable en présence de milieu de culture [88] et ne gonfle que très peu par rapport à l'alginate de calcium en présence d'ions monovalents tel que le lithium  $\text{Li}^+$  [42].

### 4.3.1 Comparaison de l'alginate de calcium et l'alginate de baryum

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ne peuvent que complexer les blocs G de l'alginate alors que les ions  $\text{Ba}^{2+}$  sont capables de complexer à la fois les blocs G et les blocs M [89]. En

plus de sa meilleure affinité, l'hydrogel que le baryum forme avec l'alginate possède une meilleure stabilité en présence de milieu de culture cellulaire [86]. Cela fait de l'alginate de baryum un bon candidat pour la fabrication de notre bioréacteur.

Tout comme pour la précédente étude, nous allons travailler avec des billes d'alginate dans un premier temps avant de travailler avec des tubes, afin de simplifier les expériences.

#### 4.3.1.1 Influence de la purification de l'alginate

La poudre d'alginate que nous utilisons est non-stérile et contient des particules non-solubles. Certaines étapes sont donc nécessaires afin de retirer ces impuretés et la stériliser. La poudre d'alginate est déposée petit à petit dans un bécher afin d'en faciliter l'hydratation. Le mélange est agité à l'aide d'un barreau magnétique pendant 2h jusqu'à la solubilisation complète de l'alginate. La solution est ensuite placée dans des tubes de centrifugation de 50 ml et centrifugée à vitesse maximale pendant une heure afin de retirer les impuretés. Nous filtrons ensuite la solution obtenue à l'aide d'un filtre seringue hydrophile d'une taille de pore de 5  $\mu\text{m}$ . La solution d'alginate est ensuite stérilisée par chauffage à 65°C pendant une heure. Après refroidissement complet à température ambiante, les tubes de solution d'alginate sont conservés à 4°C. Des billes d'alginate ont été produites selon la méthode décrite précédemment par gélification dans une solution de calcium à 100 mM ou bien de baryum à 40 mM ou à 100 mM. Après réticulation complète, ces billes ont été dialysées dans un volume dix fois plus grand d'eau ultra-pure, sans agitation, pendant une nuit afin de retirer les ions en excès.

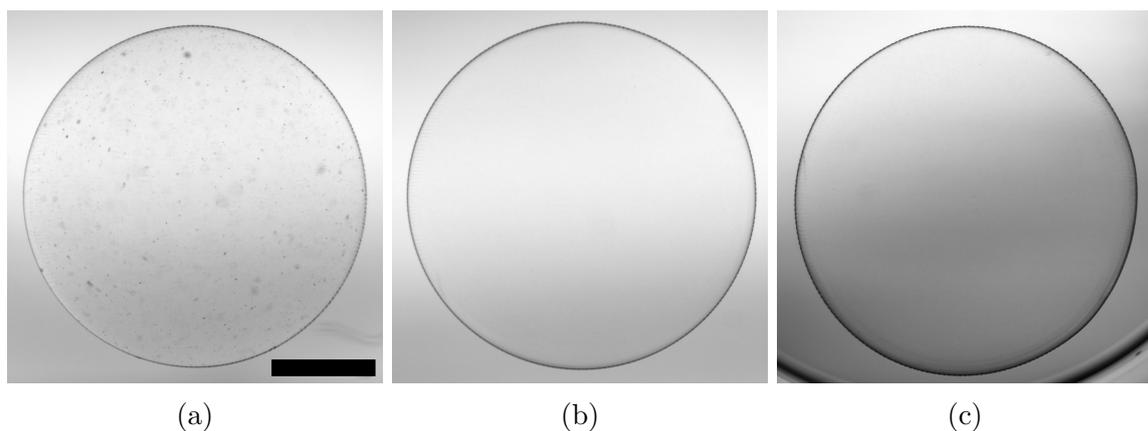


FIGURE 4.3.1 – Images obtenues par microscopie optique de billes d'alginate de calcium (100 mM) à différents degrés de purification de la solution d'alginate de sodium : (a) sans purification, (b) centrifugée et filtrée et (c) centrifugée, filtrée et stérilisée. La barre d'échelle représente 1 mm.

Lorsqu'une goutte de solution d'alginate tombe dans un bain gélifiant, des points de réticulation sont créés, ce qui provoque la contraction du réseau et l'expulsion d'eau, ou synérèse. Le volume final occupé par le gel est donc plus petit que celui occupé initialement par la solution de polymère. Dans le cas des billes d'alginate de calcium, cette contraction est d'environ 35%. Lorsque les billes d'alginate de calcium sont fabriquées à partir d'une solution d'alginate non purifiée (figure 4.3.1a), nous observons la présence d'impuretés. La centrifugation et la filtration suffisent à retirer ces impuretés (figure 4.3.1b), et la stérilisation de la solution (figure 4.3.1c) ne semble pas influencer la morphologie des billes d'alginate de calcium.

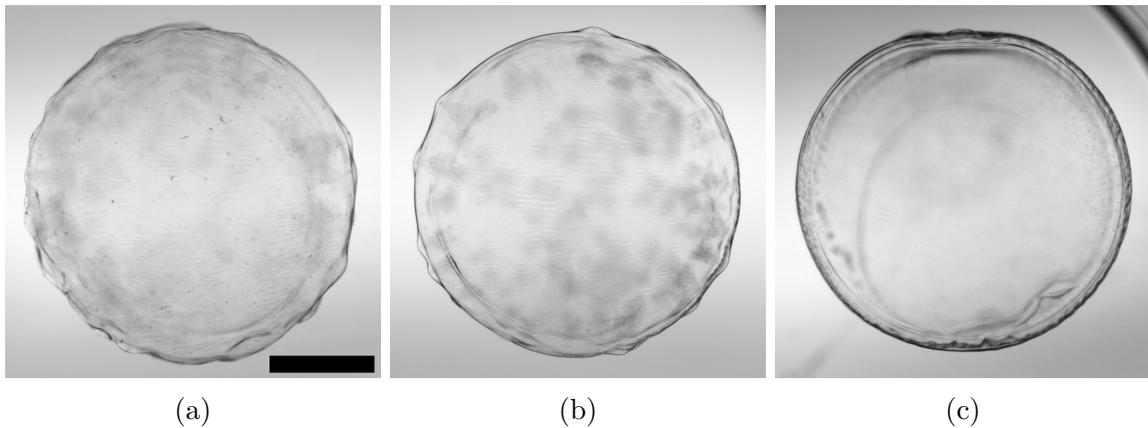


FIGURE 4.3.2 – Images obtenues par microscopie optique de billes d'alginate de baryum (40 mM) à différents degrés de purification de la solution d'alginate de sodium : (a) sans purification, (b) centrifugée et filtrée et (c) centrifugée, filtrée et stérilisée. La barre d'échelle représente 1 mm.

Les billes obtenues par la gélification de l'alginate dans une solution de baryum d'une concentration de 40 mM sont plus petites que celles obtenue dans du calcium, la synérèse est plus forte et le volume de l'hydrogel est presque 50% plus petit que celui de la solution. Les billes obtenues à partir de solution d'alginate non stérilisée (figures 4.3.2a et 4.3.2b) ont une surface d'un aspect rugueux et contiennent des structures avec un indice de réfraction différent. Lorsque la solution d'alginate a été stérilisée, la bille a une surface moins rugueuse et on n'observe plus les mêmes structures que précédemment. On distingue une nouvelle structuration en feuillets concentriques dans l'hydrogel qui semble indiquer une variation de densité de l'hydrogel. Une telle structure ainsi que l'apparence rugueuse de la surface de la bille suggèrent que le polymère est gélifié de façon inhomogène. En effet, il semble que cette bille a été gélifiée par couches successives, indiquant une compétition entre les vitesses de diffusion de l'ion baryum et sa complexation par l'alginate qui induit une contraction. Par rapport à un hydrogel formé par le calcium, la vitesse de réaction est plus rapide que la vitesse

de diffusion car le baryum a une plus forte affinité pour l'alginate et un coefficient de diffusion plus faible du fait de sa taille. Il a aussi été montré qu'une faible concentration d'ions en solution va permettre à l'alginate de diffuser vers la surface de la bille, résultant en une concentration plus élevée en alginate à la surface de la bille que dans le centre [89].

Le flux de baryum peut être augmenté en augmentant sa concentration. Lorsque les billes d'alginate sont gélifiées dans une solution d'une concentration de 100 mM, l'aspect de la bille change entièrement. L'hydrogel n'est plus transparent, et même si nous n'observons plus la structure en feuillets, nous observons une différente structuration à l'intérieur des billes. À l'œil nu, les billes d'alginate non stérilisée (figures 4.3.3a et 4.3.3b) sont blanches et rugueuses. L'alginate stérilisée, en revanche produit des billes contenant une structure polyédrique étoilée dans leur cœur. Cette structure n'est pas toujours homogène, et laisse penser qu'elle a pu être causée par une hétérogénéité dans la longueur des chaînes de polymère. En effet, la stérilisation par chauffage de la solution d'alginate diminue sa viscosité à taux de cisaillement nul de 10%, ce qui signifie que certaines longues chaînes ont été cassées. Dayeh et al. ont montré dans un système de diffusion-réaction par précipitation que la précipitation d'un cation présent dans un gel, pour éviter toute convection, avec un anion qui diffuse depuis l'extérieur forment une structure en anneaux concentriques à de faibles concentrations en cation et des "points" avec une symétrie hexagonale quand cette concentration est augmentée [90]. Les auteurs font d'ailleurs un parallèle avec une séparation de phase par décomposition spinodale, processus par lequel un mélange peut se séparer en régions distinctes avec des concentrations de matériaux différents. Par la diffusion-réaction du baryum dans l'alginate, nous obtenons des structures avec une morphologie similaire, suggérant que le traitement thermique produit des chaînes assez courtes de polyélectrolytes chargés négativement capables de diffuser et précipiter avec  $Ba^{2+}$  sans être gênées par l'enchevêtrement des longues chaînes d'alginate. Afin de confirmer cela, des expériences complémentaires sur des solutions d'alginate à distribution de longueur de chaînes mieux contrôlées doivent être menées pour élucider ce phénomène.

#### 4.3.1.2 Comportement de l'hydrogel dans les conditions physiologiques

Les billes sont alors divisées en deux conditions :

- soit placées, pendant 24h, dans une solution contenant 150 mM de NaCl (10 billes dans 15 ml), afin de reproduire les conditions physiologiques imposées par les milieux de culture, puis placées dans du milieu de culture M9.
- soit placées directement dans le milieu de culture M9

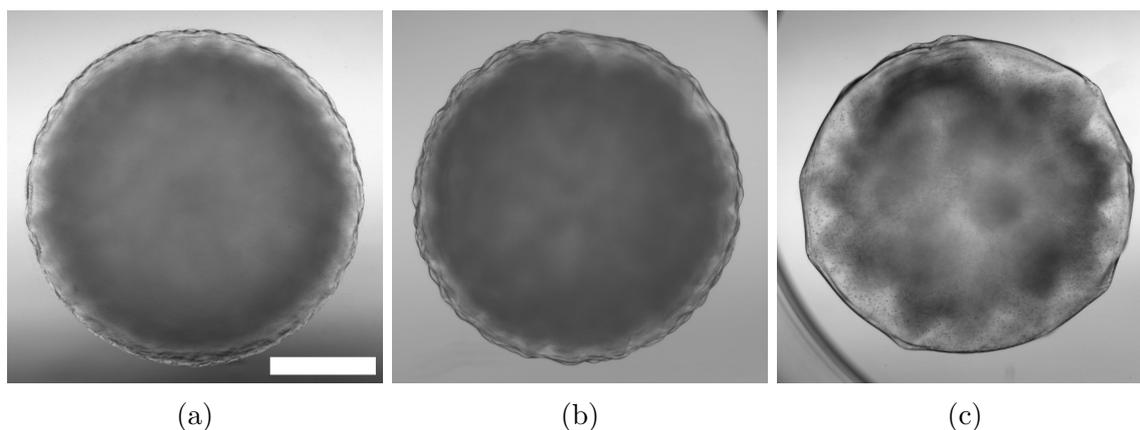


FIGURE 4.3.3 – Images obtenues par microscopie optique de billes d’alginate de baryum (100 mM) à différents degrés de purification de la solution d’alginate de sodium : (a) sans purification, (b) centrifugée et filtrée et (c) centrifugée, filtrée et stérilisée. La barre d’échelle représente 1 mm.

Le gonflement des billes est suivi par imagerie. Le diamètre des billes est mesuré et en faisant l’hypothèse que les billes sont bien sphériques, le volume des billes est ainsi calculé.

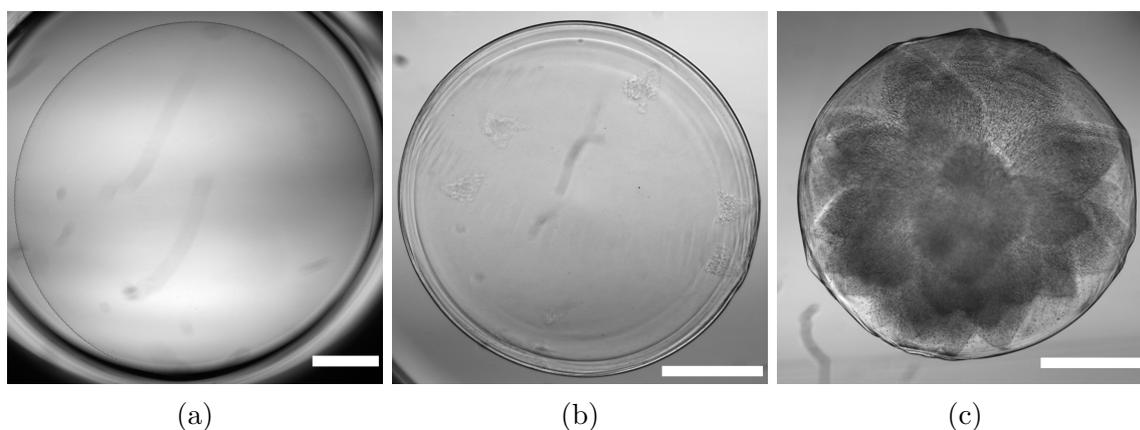


FIGURE 4.3.4 – Images obtenues par microscopie optique de billes d’alginate (a) de calcium (100 mM) ou (b),(c) de baryum (40 mM et 100 mM respectivement) après 24h d’incubation dans une solution saline physiologique à 150 mM de NaCl. Les barres d’échelles représentent 1 mm et (a) est à une échelle différente que (b) et (c).

Lorsque les billes d’alginate de calcium sont incubées dans une solution saline pendant 24h, nous observons un très fort gonflement de l’hydrogel qui occupe un volume trois fois supérieur. Dans cette situation, l’hydrogel n’est pas entièrement dissous car il n’est pas dans un système infiniment dilué. Lorsque le bain de gélification est composé de chlorure de baryum à 40 mM, on observe un gonflement de 150 % des billes

immergées dans la solution saline par rapport à leur volume initial (figure 4.3.4b). Si ce bain est encore plus concentré, dans le cas des billes à 100 mM, il n'y a pas de différence de taille entre la bille avant et après incubation dans de l'eau salée (figure 4.3.4c). L'objectif de cette thèse étant de produire un bioréacteur observable par microscopie, nous cherchons à travailler avec un matériau transparent. L'alginate à 100 mM ne conviendra pas malgré sa bonne stabilité dans une solution physiologique car il n'est pas transparent. Nous décidons de travailler avec les billes d'alginate 40 mM car même si elles gonflent légèrement, contrairement à l'alginate de calcium, l'hydrogel ne se dissout pas.

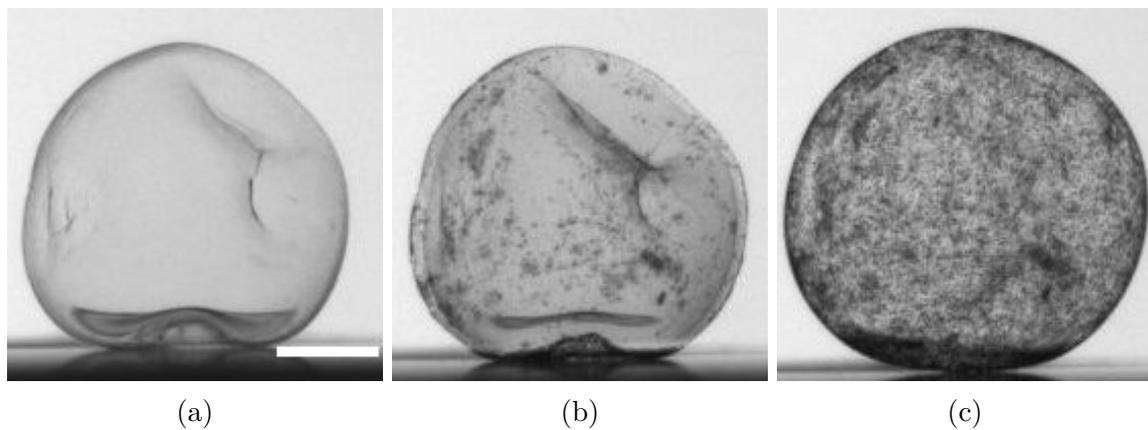


FIGURE 4.3.5 – Évolution dans le temps de billes d'alginate de baryum 40mM dans du milieu de culture M9 à (a)  $t=0$  h, (b)  $t=0,25$  h et (c)  $t=4$  h. La barre d'échelle mesure 1 mm.

Le milieu d'incubation est ensuite complexifié par l'utilisation du milieu de culture M9 qui est composé de nombreux sels dont du sodium (150 mM) et des ions phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$  70 mM). Lorsque des billes préalablement dialysées dans de l'eau ultra-pure sont placées dans le milieu M9, nous remarquons la formation progressive de précipités (figure 4.3.5) couplée à un léger gonflement de la bille. La dialyse des billes dans de l'eau ultra-pure n'est donc pas suffisante pour éviter la précipitation des ions phosphate avec les ions baryum qui forme des cristaux de phosphate de baryum. Le phosphate est nécessaire pour la production d'énergie dans les cellules, et il est stocké sous la forme d'une molécule appelée adénosine triphosphate (ou ATP). C'est son hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique (Pi) qui libère de l'énergie. Il est donc impossible de retirer ces ions de la formulation du milieu de culture. Il faut donc une solution pour retirer tous les ions baryum labiles ayant une faible interaction avec l'alginate

Nous savons que les billes d'alginate de baryum 40 mM gonflent lorsqu'elles sont

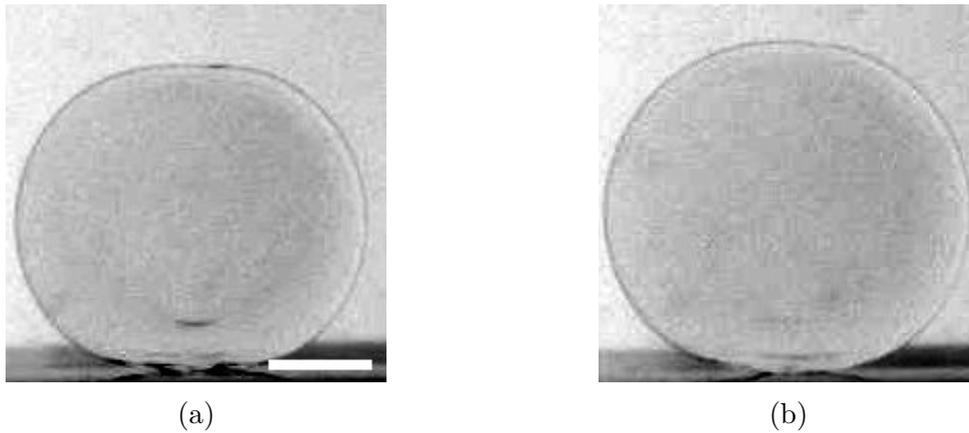


FIGURE 4.3.6 – Évolution dans le temps de billes d'alginate de baryum 40 mM préalablement dialysées dans une solution saline, dans du milieu de culture M9 à (a)  $t=0,25$  h et (b)  $t=4$  h. La barre d'échelle mesure 1 mm.

incubées pendant 24h dans une solution de NaCl à 150 mM. Cela veut dire que les complexes interagissant faiblement ont été dissous et les ions baryum ont diffusé en dehors de l'hydrogel. Les billes qui ont été ainsi "dialysées" sont alors immergées dans le milieu de culture M9 : elles ne présentent pas de précipités (figure 4.3.6). Nous décidons alors de produire des tubes d'alginate dans un bain de baryum 40mM qui subiront une étape d'incubation dans une solution de sodium à 150 mM.

#### 4.3.1.3 Étude sur les tubes

En suivant le protocole décrit précédemment, nous fabriquons des tubes d'alginate de baryum 40 mM. Cette concentration en cations permet de maintenir l'isodensité des solutions et l'hydrogel résultant possède moins de structures diffusant la lumière qu'à des concentrations plus élevées. L'extrusion de tubes d'alginate de baryum produit des tubes qui ont un aspect très rugueux (figure 4.3.7a). Après trois jours dans une solution physiologique de NaCl à 150 mM, ces tubes gonflent légèrement, mais gardent leur aspect non-lisse. Ces tubes, tout comme les billes apparaissent composés de plusieurs feuillets concentriques (figure 4.3.7b). Lorsque le tube est découpé dans le sens de la longueur, nous sommes capables de séparer les différents feuillets d'alginate. L'alginate de baryum n'est donc pas idéal pour la formation de tubes d'hydrogel pour notre application.

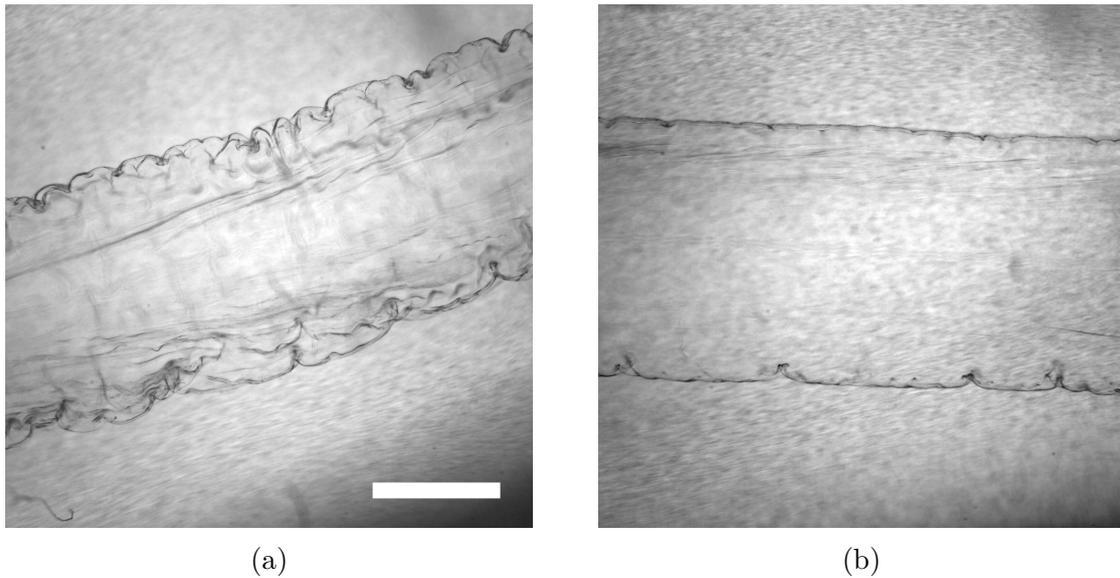


FIGURE 4.3.7 – Image obtenues par microscopie optique d'un tube de baryum 40 mM (a) après dialyse dans de l'eau ultra-pure et (b) après 3 jours dans une solution physiologique. La barre d'échelle mesure 1 mm.

#### 4.3.1.4 Conclusions

Lorsque nous comparons le comportement de l'alginate de calcium à l'alginate de baryum en condition de culture bactérienne, nous constatons que la gélification de l'alginate avec l'ion baryum permet la production d'un hydrogel plus stable. Cependant, lorsque nous extrudons des tubes d'alginate dans un bain de baryum, le résultat ne convient pas à notre application. Afin de produire des tubes d'alginate à l'aspect homogène, nous décidons alors de travailler avec des tubes d'alginate de calcium renforcés par un échange ionique par une solution de baryum.

### 4.3.2 Échange ionique : de l'alginate de calcium vers un alginate de baryum

L'hydrogel d'alginate est un gel physique maintenu par la complexation de cations ayant une affinité avec le poly-électrolyte et en présence de cations ayant une meilleure affinité avec l'alginate, l'équilibre du complexe alginate-calcium-alginate sera alors déplacé vers la formation du complexe alginate-baryum-alginate dont les liens sont plus forts car la distance entre les constituants du complexe est plus faible. Ainsi, puisque les nœuds de réticulation du réseau de l'hydrogel auront déjà été formés par le calcium, l'échange ionique s'ensuivant pourra permettre l'élaboration d'un hydrogel plus résistant aux tampons biologiques et ayant un aspect homogène.

Cation	Diamètre (eau)	Diamètre (NaCl)
$\text{Ca}^{2+}$ 100 mM	$3,32 \pm 0,03$ mm	-
$\text{Ba}^{2+}$ 40 mM	$3,15 \pm 0,05$ mm	$3,55 \pm 0,05$ mm
$\text{Ca}^{2+}$ 100 mM puis $\text{Ba}^{2+}$ 40 mM	$3,16 \pm 0,02$ mm	$3,43 \pm 0,02$ mm

TABLE 4.3 – Tableau comparatif des diamètres dans l'eau et dans une solution de 150 mM de sodium des billes d'alginate gélifiées dans un bain de calcium, un bain de baryum ou doublement réticulées dans un bain de calcium puis baryum

Des billes d'alginate de calcium 100 mM sont fabriquées puis dialysée après gélification complète et ensuite placées dans une solution de baryum 40 mM. Après une nuit, ces billes sont rincées puis placées dans une solution de NaCl 150 mM. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.3. Nous observons que le diamètre des billes d'alginate de calcium diminue d'environ 5% lorsqu'elles ont subi un échange ionique dans un bain de baryum (figure 4.3.8b) et qu'elles mesurent le même diamètre que les billes d'alginate de baryum (figure 4.3.2c), mais les deux hydrogels n'ont pas la même structure. En effet, l'hydrogel après échange ionique semble avoir gardé la structure plus uniforme observée dans les billes d'alginate de calcium. De plus, lorsque ces billes sont incubées dans une solution saline, leur gonflement est plus faible que celui observé pour les billes gélifiées dans une solution de baryum uniquement et elles ne sont que légèrement plus larges (3%) que les billes gélifiées dans une solution de calcium uniquement. Grâce à ces étapes post-gélification de l'alginate dans un bain de calcium, nous sommes donc capables de produire un hydrogel d'alginate ayant une structure macroscopique similaire à un hydrogel d'alginate de calcium mais pouvant résister à une forte concentration en ions sodium, tel un hydrogel d'alginate de baryum.

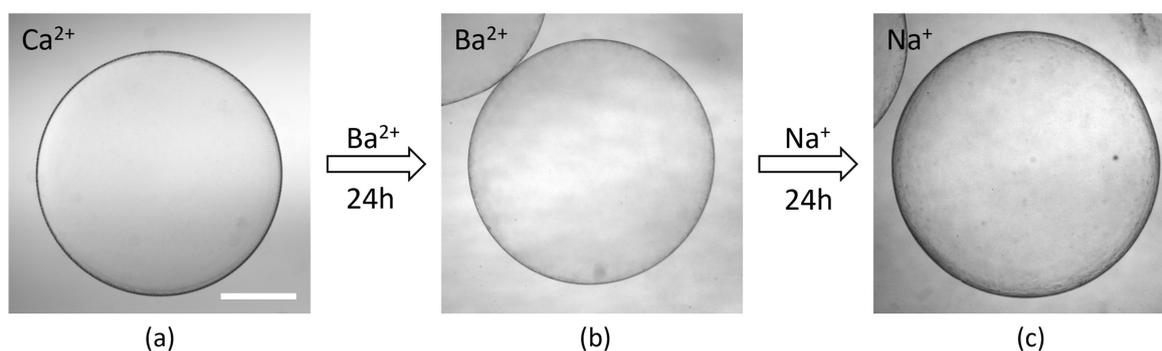


FIGURE 4.3.8 – Image obtenues par microscopie optique d'une bille (a) d'alginate de calcium à 100 mM (b) incubée pendant 24h dans une solution de  $\text{BaCl}_2$  à 40 mM puis (c) dans une solution de NaCl à 150 mM pendant 24h. La barre d'échelle mesure 1 mm.

### 4.3.3 Protocole de fabrication d'un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel

Maintenant que nous avons caractérisé et adapté notre système à la culture de bactéries en flux, nous pouvons établir un protocole pour la fabrication du bioréacteur. Des tubes d'alginate de calcium sont formés et collés aux capillaires de verre et montés dans une boîte de pétri, selon le protocole précédemment décrit. L'alginate étant bio-sourcé, il peut arriver que nos tubes d'alginate soient contaminés par des micro-organismes provenant de l'alginate. La stérilisation par chauffage ne suffit pas toujours à éviter la contamination, et elle est particulièrement visible lorsque l'hydrogel a été préparé plus de 24h auparavant. Afin de pouvoir travailler avec un hydrogel le plus fraîchement préparé possible, nous cherchons à minimiser le temps nécessaire pour équilibrer l'hydrogel avec nos différentes solutions. L'équilibre se fait dans un système sans agitation, le temps nécessaire sera donc fortement dépendant de la diffusion des ions dans la membrane d'alginate. Le temps  $t$  peut donc être évalué ainsi :  $t \sim \frac{l^2}{D}$ , avec  $l$  l'épaisseur de la membrane ( $l = 0,5$  mm) et  $D$  le coefficient de diffusion de l'ion. Dans de l'eau, les coefficients de diffusion des ions baryum et sodium sont respectivement  $D_{\text{Ba}^{2+}} = 1,186 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $D_{\text{Na}^+} = 1,481 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [91]. Ainsi le temps de diffusion nécessaire à ces ions pour traverser la membrane est respectivement de l'ordre de 4 et 3 minutes.

Le système tube-capillaire est donc rincé à l'eau ultra-pure et immergé successivement pendant 30 minutes dans chaque solution :

- 40mM de  $\text{BaCl}_2$  : cette étape permet la diffusion des ions baryum dans l'hydrogel d'alginate
- 150mM de  $\text{NaCl}$  : cette étape permet la diffusion des ions baryum faiblement liés hors du tube d'alginate. Le tube obtenu est légèrement plus mou que s'il n'avait pas été incubé dans une solution saline, cependant il reste résistant à l'étirement.
- M9 : cette étape permet d'équilibrer le tube avec le milieu de culture afin de le préparer pour les bactéries

Enfin, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais avant d'injecter les bactéries dans le tube.

## 4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé et mis en place un procédé de fabrication d'hydrogel d'alginate en vue d'une application biologique. Grâce au traitement de

surface par la poly-L-lysine, nous sommes capables de coller les tubes d'alginate à un outil permettant de les manier et de les perfuser. Cette adhésion est forte dans l'eau pure, mais le tube se décolle et se dissout dans le milieu de culture. Pour pallier ce problème nous avons modifié légèrement la composition ionique de l'hydrogel par une gélification dans un bain de calcium puis un échange ionique dans un bain de baryum, permettant le déplacement de l'équilibre alginate- $\text{Ca}^{2+}$  vers alginate- $\text{Ba}^{2+}$ . Une étape complémentaire de dialyse par l'incubation dans une solution saline rend alors le tube d'alginate de calcium compatible avec une culture de bactéries.

# Chapitre 5

## Bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il est possible de fabriquer un tube d'hydrogel d'alginate manipulable qui reste stable dans les conditions salines de culture bactérienne. Dans ce chapitre, nous allons mettre en application ce bioréacteur. Dans un premier temps, le tube est placé dans une boîte de pétri. Cette expérience préliminaire a pour but de vérifier la stabilité et la stérilité du système. Dans un second temps, nous complexifions le système par l'élaboration et l'utilisation d'une cellule à flux. Nous pourrions ainsi non seulement perfuser l'intérieur du tube d'alginate mais aussi agir sur le milieu extérieur, afin de pouvoir en modifier la composition. Grâce à ce système, nous mettrons en place un chémostat en flux pour la culture de bactéries qui permettra la production de biomasse, mais qui pourrait aussi servir pour des études d'évolution et d'adaptation de la bactérie à son environnement.

### 5.1 Introduction

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires qui mesurent en moyenne entre 1 et 10  $\mu\text{m}$ , et pèsent de l'ordre de  $10^{-12}$  grammes. Ce sont des cellules procaryotes : leur noyau cellulaire n'est pas délimité par une membrane et elles ne possèdent en général pas d'autres structures internes. Au-delà de la membrane cytoplasmique, les bactéries possèdent une paroi constituée de peptidoglycane. Certaines bactéries possèdent uniquement une paroi épaisse et complexe, elles sont dites Gram-positives car elles sont colorées par la coloration de Gram. Les autres bactéries possèdent une paroi de peptidoglycane plus fine puis une membrane externe qui est imperméable au colorant de Gram, elles sont donc Gram-négatives. C'est le cas par exemple de la

bactérie *Escherichia coli*. On appelle périplasma le volume entre les deux membranes qui contient la paroi. Les bactéries possèdent souvent des structures extra-cellulaires mais elles ne sont pas nécessaires et donc pas toujours présentes [39].

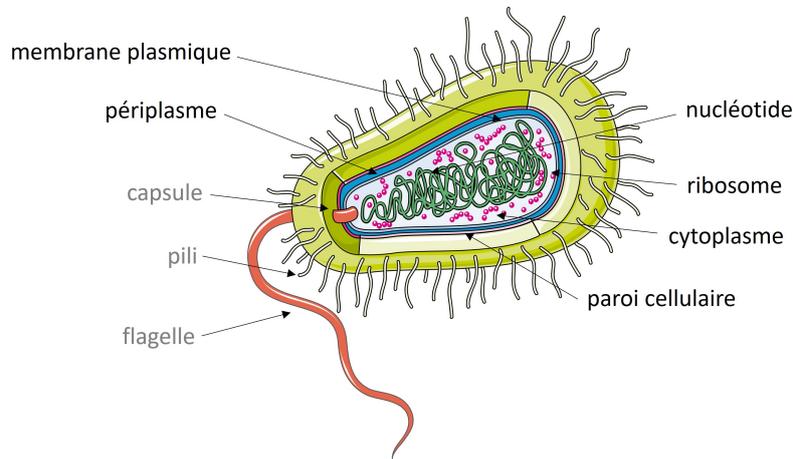


FIGURE 5.1.1 – Schéma de la structure d'une bactérie. Les structures facultatives sont indiquées en gris

Les bactéries constituent la plus grande partie de la biomasse sur Terre, et on estime qu'il en existe environ  $10^{12}$  espèces [92]. Elles sont présentes dans presque tous les environnements terrestres : du haut des montagnes et au fond de l'océan, mais aussi dans les plantes et les animaux. Par exemple, près de  $10^{14}$  bactéries habitent le corps humain [92]. Certaines bactéries sont pathogènes, c'est à dire qu'elles peuvent causer des maladies. Mais elles sont pour la plupart bénéfiques, et certaines sont même symbiotiques : elles contribuent au bon fonctionnement de leur hôte. De plus, de nombreuses bactéries sont utilisées pour la production de produits chimiques et de médicaments et elles sont également de grande importance dans l'industrie agro-alimentaire pour les processus de fermentation [41]. Ainsi il est important de pouvoir cultiver et étudier les bactéries.

La majorité des connaissances que nous avons aujourd'hui sur les bactéries provient d'études sur bactéries pathogènes ou des souches isolées. L'étude des micro-organismes dans un laboratoire nécessite de reproduire leurs conditions de vie dans leur habitat naturel. Pour survivre, les bactéries ont besoin d'une source de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre ainsi que de sels inorganiques (potassium, magnésium, sodium, calcium...). Certaines bactéries ont besoin d'oxygène. Dans le commerce, il existe de nombreux milieux de culture pour cultiver les bactéries. De façon classique, la culture de bactéries peut être faite en milieu liquide ou en milieu solide. La culture en milieu solide permet de sélectionner une colonie spécifique de bactéries que l'on pourra par

la suite propager en culture liquide.

Au cours de leur croissance en milieu liquide, les bactéries consomment les nutriments, et oxygène, présents dans le milieu de culture et rejettent des composés toxiques issus de leur métabolisme. Il est donc nécessaire de changer le milieu de culture fréquemment. La croissance bactérienne est décrite dans la figure 5.1.2 :

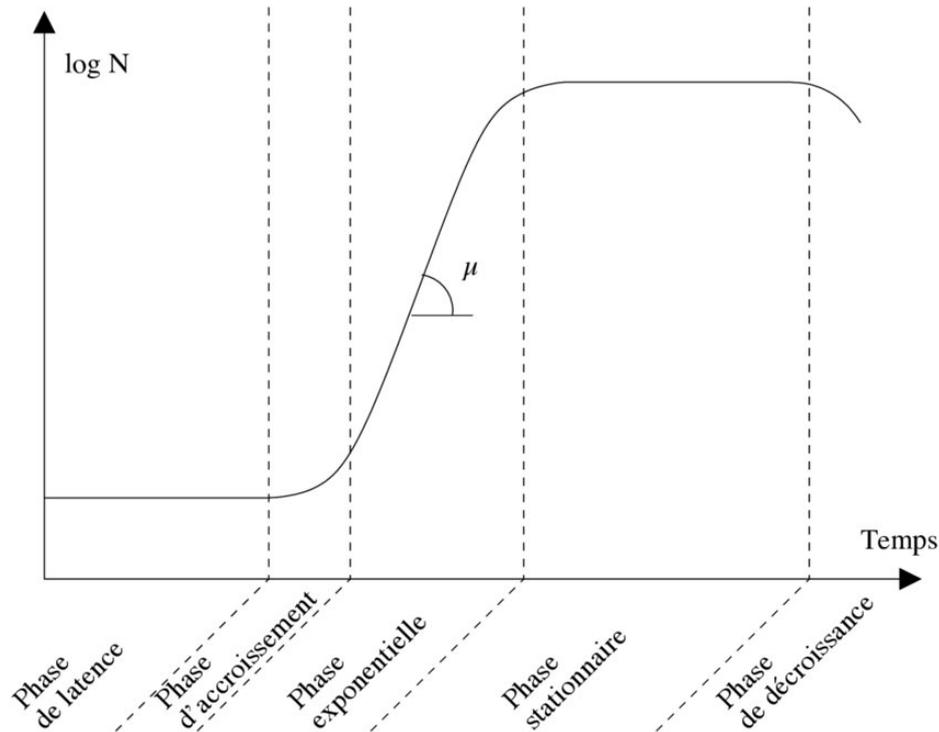


FIGURE 5.1.2 – Courbe de croissance d'une bactérie [93]

- une phase de latence où le taux de croissance est nul. Elle est caractéristique du repiquage d'une culture : c'est le temps nécessaire à la population bactérienne pour s'adapter à leur nouvel environnement. Lors d'une repique dans un milieu identique à la culture initiale, le temps de latence est très faible.
- une phase d'accroissement où certaines bactéries commencent à se diviser
- une phase de croissance exponentielle où toutes les bactéries se divisent à une vitesse constante et maximum, et le coefficient directeur de cette partie linéaire de la courbe,  $\mu_{max}$ , est le taux de croissance maximal.
- une phase stationnaire où le nombre de bactéries qui meurent et qui prolifèrent se compense. Cette phase est déclenchée par l'épuisement du milieu et l'accumulation de déchets toxiques libérés dans le milieu par les bactéries.

- une phase de décroissance due à une lyse cellulaire, phénomène de dégradation cellulaire due à la rupture de la membrane plasmique : les bactéries sont en train de mourir.

La croissance des bactéries est unicellulaire, ou planctonique, mais on retrouve souvent des agrégats composés de nombreuses espèces de bactéries. Ces agrégats peuvent former des structures appelées biofilms. En 1943, le biologiste marin Claude Zobell a décrit le 'bottle effect', montrant que les micro-organismes sont capables de vivre attachés à une surface. Ce comportement se trouve être une règle plutôt qu'une exception. Les biofilms sont décrits comme un consortium de micro-organismes qui sont attachés à une surface biotique ou abiotique. C'est un amas structuré de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique, attaché à une surface [94]. Le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, qui sont présents dans l'environnement ou bien produits par les cellules bactériennes. Cela protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles : les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes à la dessiccation et aux biocides (antibiotiques et désinfectants) que les cellules bactériennes planctoniques. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs micro-organismes et on estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. La présence de biofilms lors d'infections interfère avec le traitement et demande donc de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement.

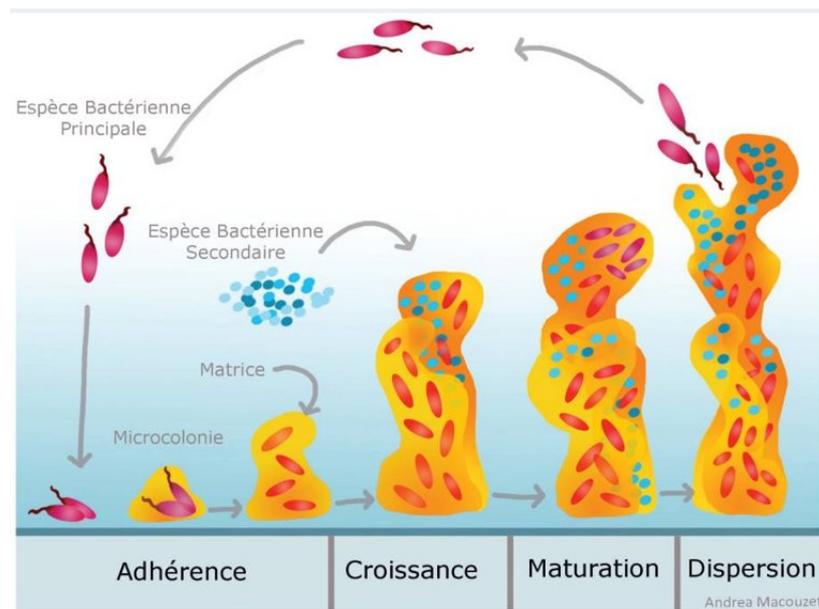


FIGURE 5.1.3 – Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien [95]

Les biofilms sont capables de contenir de multiples types cellulaires, avec des différentes capacités métaboliques, et sa formation peut être très rapide car quelques heures suffisent [96], et se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi décrit dans la figure 5.1.3 :

- Adhérence : Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (ex. cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (ex. plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation). L'adhérence est réversible. Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie (ex. fimbriae, flagelle)
- Croissance : Les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des micro-colonies.
- Maturation : Les bactéries synthétisent un exo-polysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents
- Dispersion : L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes. Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : des perturbations mécaniques, la dégradation enzymatique de la matrice polymérique, la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché, l'induction de la motilité, la production d'agents tensioactifs et le relâchement de l'exo-polysaccharide. Le détachement et la dispersion de cellules bactériennes d'un biofilm jouent un rôle important dans la transmission de bactéries de réservoirs environnementaux à un hôte, dans la transmission entre les hôtes et dans la propagation de l'infection chez un hôte

Parmi les biofilms qui ont éveillé l'intérêt des chercheurs, on retrouve le microbiote intestinal, qui a été plus profondément discuté dans l'état de l'art (partie ??), dont la fonction a été fortement liée au métabolisme de l'hôte. *Escherichia coli* est une des nombreuses espèces de bactéries, présentes dans le microbiote intestinale, capable de former un biofilm. Elle est présente dans la flore intestinale qui abrite environ 1 kg de bactéries actives sur une surface dépliée de 32 m<sup>2</sup>. La culture du microbiote en laboratoire étant compliquée, car difficile d'accès, ce sont les techniques de biologie moléculaire associées à des outils bio-informatiques qui ont permis de décrire l'écologie et la structure du microbiote intestinal humain [97, 4]. Ainsi, la mise en place d'une culture de bactéries dans un environnement chimiquement contrôlé afin de pouvoir étudier l'adaptation et l'évolution de bactéries semble pertinent. Le bioréacteur tubu-

laire à base d'hydrogel que nous élaborons dans cette thèse, grâce aux caractéristiques de l'alginate, permet l'observation de cellules ou de bactéries dans une enceinte semi-perméable où les petites molécules comme l'oxygène ou les nutriments, contrairement aux bactéries qui sont des grosses particules, peuvent diffuser à travers la membrane d'hydrogel. La mise en place de différents flux pourra permettre de mimer les changements environnementaux, par un gradient diffusif, mais aussi appliquer directement un cisaillement aux bactéries.

## 5.2 Application du bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel

### 5.2.1 Matériel et méthodes

#### 5.2.1.1 Produits chimiques

Durant cette thèse, nous avons travaillé dans un premier temps avec du milieu LB. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, ce milieu de culture ne convient pas à notre système. Dans un second temps, nous avons donc décidé de travailler avec le milieu M9 car nous pouvons aisément en modifier la composition.

- Composition du milieu LB utilisé dans la partie 4.2.2.1.2 (1 litre) :
  - Poudre LB (SIGMA) : NaCl (170 mM), Tryptone 10 g/L, Extrait de levure 5 g/L
  - Ampicilline : 200 µg/ml
  - CaCl<sub>2</sub> : 2 mM
- Composition du milieu M9 (1 litre) :
  - Sels M9 (5X, SIGMA) : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (22 mM), NaCl (8,6 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (47,8 mM), NH<sub>4</sub>Cl (18,9 mM)
  - CaCl<sub>2</sub> : 0,9 mM
  - MgSO<sub>4</sub> : 2 mM
  - Glucose : 20 mM
  - Chloramphenicol : 25µg/ml
  - Hydrochlorure de thiamine : 1 mM (milieu riche uniquement)
  - Acides casamino : 0.2 % (milieu riche uniquement)

Le milieu M9 sans thiamine et acides casamino est appelé milieu pauvre car il ne contient que du glucose comme source de nutriments pour les bactéries. Le milieu riche se réfère au milieu M9 supplémenté en thiamine et acides casamino.

### 5.2.1.2 Souches bactériennes

Les deux souches bactériennes utilisées dans cette thèse sont de l'espèce *Escherichia coli*. *E. coli* est l'espèce anaérobie facultative, c'est à dire qu'elle a un métabolisme qui lui permet de s'adapter en présence ou absence d'oxygène, la plus présente dans le microbiote intestinal humain. Bien qu'il existe des souches pathogènes, dans le système digestif, *E. coli* est majoritairement inoffensive. Cependant, si la bactérie intestinale se déplace vers un autre organe, elle peut devenir pathogène. La souche *E. coli* UMN, par exemple, a été extraite en 1999 d'une patiente avec une infection du tractus urinaire. *E. coli* est l'espèce de bactérie la plus étudiée car, dans les conditions optimales, elle est facile à cultiver en laboratoire : une vingtaine de minutes à 37°C dans un milieu riche suffisent à certaines souches pour se dédoubler. Il semblerait, par ailleurs, que la souche UMN026 souche soit capable de s'adapter à de faibles doses d'antibiotique bactériostatique (chloramphénicol), bien qu'elle n'ait pas de résistance connue. La deuxième souche qui a été utilisée est PBR322. Cette bactérie a été génétiquement modifiée par l'insertion d'un ADN circulaire, ou plasmide, conférant à la bactérie une fluorescence CFP (Cyan Fluorescent Protein) si la bactérie consomme du glucose, ou m-cherry (rouge) si la bactérie consomme du xylose comme source de carbone. Ce plasmide contient un gène de sélection avec une résistance antibiotique au chloramphénicol, antibiotique non-bactéricide. Ce gène permet donc de ne laisser se diviser que les bactéries qui possèdent la résistance antibiotique car la croissance des autres bactéries sera inhibée.

### 5.2.1.3 Support de culture

Afin de pouvoir perfuser les tubes d'alginate tout en les maintenant dans un environnement aqueux stérile, des supports de culture ont été conçus. Les supports de culture sont stérilisés avec lavage à l'eau de javel puis à l'eau et au savon. Ils sont ensuite bien rincés à l'eau distillée avant d'être vaporisés avec de l'éthanol à 70 % et séchés sous atmosphère stérile (sous poste de sécurité microbiologique, ou PSM). Les raccords et tubulures ont été stérilisés par autoclavage à 121°C.

#### 5.2.1.3.1 Boîte de pétri modifiée

Le support utilisé dans un premier temps est une boîte de pétri d'un diamètre de 150 mm percée en deux points diamétralement opposés. Un tronçon de 2 cm de tube flexible en silicone est collé dans chaque trou pour pouvoir y fixer les capillaires en verre (figure 5.2.1a). Le tube d'alginate est ensuite monté dans ce système en suivant le protocole référencé en 4.2.1.2.3. Cette enceinte très simple permet la perfusion du

tube d'alginate, tout en le maintenant dans un milieu aqueux stérile. Le milieu interne au tube d'hydrogel peut néanmoins communiquer avec le milieu externe par diffusion des solutés. Ainsi, il est possible de remplacer le milieu de culture à l'extérieur du tube sans affecter mécaniquement les bactéries.

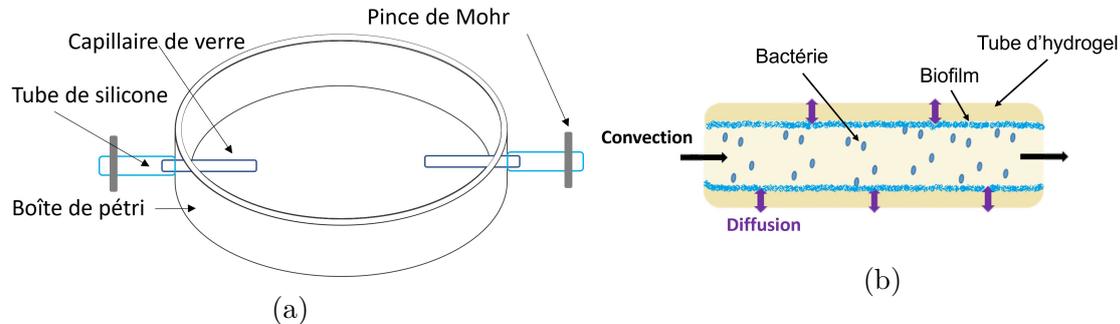


FIGURE 5.2.1 – Représentation schématique (a) de la boîte de pétri servant comme support au tube d'alginate et (b) d'une culture de bactéries pouvant former un biofilm dans un tube d'hydrogel d'alginate perfusé.

### 5.2.1.3.2 Cellule de flux en acier inoxydable

Dans un second temps, le système a été complexifié. Avec l'aide de Ludovic Olanier (SIMM, ESPCI), nous avons conçu et usiné une cellule en inox possédant une fenêtre d'observation, consistant en une lame de verre de microscopie (75 mm x 26 mm) collée, pour placer le tube d'alginate (figure 5.2.2). La cellule en inox étant moins large et moins profonde que la boîte de pétri, mais aussi à cause de sa géométrie, il a fallu modifier le protocole d'insertion du tube d'alginate sur le capillaire en verre. Les tubes en PTFE servant à perfuser les différents canaux sont tout d'abord insérés dans un tube flexible de diamètre externe de 2,5 mm. L'ensemble tube en PTFE - tube flexible est ensuite inséré de force dans les canaux, conçus de sorte qu'ils soient plus petits que le tube flexible (2,4 mm). L'élasticité du tube flexible est ce qui garantit l'étanchéité du raccord. Les tubes dépassant dans les canaux non centraux sont coupés au ras de la cellule à l'aide d'une lame de rasoir, les capillaires sont insérés dans les canaux centraux. La cellule est ensuite remplie de solution de calcium et le tube d'alginate est inséré. Le protocole décrit en 4.3.3 est ensuite suivi pour la mise à l'équilibre du tube dans les différents milieux ioniques.

Grâce à cette cellule, il est possible perfuser le tube d'alginate, mais aussi le milieu externe au tube d'alginate, permettant, entre autres, un apport de nutriments frais. Deux entrées, représentées par des flèches jaunes et bleues dans la figure 5.2.2 de part

## 5.2. APPLICATION DU BIORÉACTEUR TUBULAIRE À BASE D'HYDROGEL97

et d'autre du canal auquel est rattaché le tube d'alginate permettent d'implémenter un gradient de concentration chimique stationnaire le long du tube, créé par un phénomène de convection-diffusion [98] que nous allons maintenant décrire.



FIGURE 5.2.2 – Photographie de la cellule de flux en acier inoxydable. Un tube d'hydrogel coloré au bleu alcian est maintenu en place dans la cellule par deux capillaires de verre. Les flèches jaune et bleu représentent respectivement les canaux supérieur et inférieur dans la figure 5.2.3. Les flèches vertes représentent l'effluent.

L'équation de convection-diffusion d'un soluté de concentration  $c$  et ayant un coefficient de diffusion  $D$ , est

$$\partial_t c + \mathbf{u} \cdot \nabla c = D \nabla^2 c. \quad (5.2.1)$$

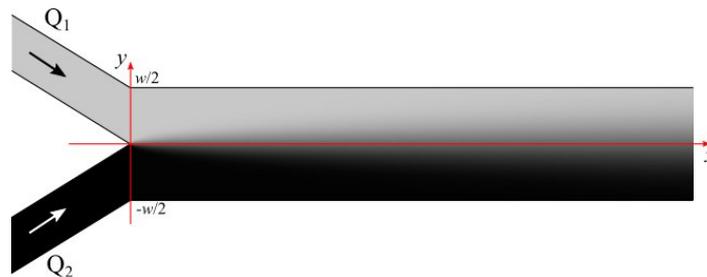


FIGURE 5.2.3 – Diffusion latérale d'un soluté dans une géométrie de co-écoulement pour  $Q_1 = Q_2$ .

Pour un co-écoulement stationnaire dans un canal droit ayant une section rectangulaire constante avec un rapport d'aspect élevé (Figure 5.2.3) et sans considérer le profil d'écoulement parabolique le long de la petite dimension [99, 100], la précédente équation se simplifie ainsi :

$$U \partial_x c = D \partial_x^2 c. \quad (5.2.2)$$

Si le soluté est uniquement présent dans le flux du dessus (flux  $Q_1$  représenté par la flèche jaune dans la figure 5.2.2) à une concentration  $c_0$  et pour un débit égal, la solution de l'équation 5.2.2 est

$$c(x, y) = \frac{1}{2}c_0 \left( 1 - \operatorname{erf} \left( \frac{y}{2L(x)} \right) \right), \quad (5.2.3)$$

avec la longueur caractéristique de diffusion

$$L(x) = \left( \frac{Dx}{U} \right)^{1/2} = \left( \frac{wx}{Pe} \right)^{1/2}, \quad (5.2.4)$$

où  $w$  est la largeur du canal et le nombre de Péclet  $Pe$  qui représente le rapport temps de diffusion sur le temps de transport par convection

$$Pe = \frac{Uw}{D}. \quad (5.2.5)$$

La fonction erreur est définie comme

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-u^2} du. \quad (5.2.6)$$

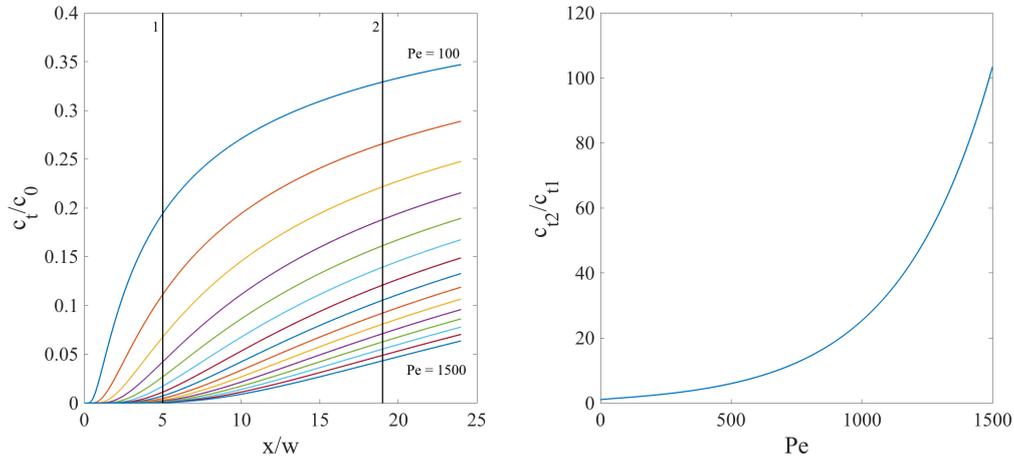


FIGURE 5.2.4 – (a) Évolution de la concentration d'un soluté le long du tube généré par un l'écoulement décrit en figure 5.2.3, de concentration initiale  $c_0$ , du canal supérieur vers le tube d'alginate, avec  $c_t$  la concentration de la molécule d'intérêt le long du tube, pour une variation de nombre de Péclet  $Pe$  par pas de 100 entre 100 et 1500. Les lignes verticales 1 et 2 représentent le début et la fin de la fenêtre d'observation de la cellule. (b) représente la variation de la concentration entre les points 1 et 2 selon le nombre de Péclet.

## 5.2. APPLICATION DU BIORÉACTEUR TUBULAIRE À BASE D'HYDROGEL99

La figure 5.2.4 décrit la diffusion, le long du tube d'alginate, d'un soluté du canal supérieur (jaune sur la figure 5.2.2) vers le tube d'alginate. Nous observons sur la figure 5.2.4a que plus le nombre de Péclet est faible, plus la pente de la courbe entre les points 1 et 2 est faible. Ainsi, plus le débit d'injection  $U$  sera faible (équation 5.2.5), plus le gradient sera petit mais la concentration sera élevée. Pour une petite molécule comme le glucose par exemple, avec un coefficient de diffusion  $D = 6,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [101], des débits caractéristiques du gradient de diffusion selon le nombre de Péclet peuvent être calculés : pour  $Pe=100$  le débit nécessaire est de  $0,98 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ , et celui pour obtenir  $Pe=1500$  est de  $14,5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 5.2.2 Résultats et discussion

#### 5.2.2.1 Expériences préliminaires

Dans un premier temps, nous mettons en culture des bactéries dans un tube d'hydrogel placé dans une boîte de pétri. Ce système plutôt simple à mettre en place permet de maintenir le tube d'hydrogel dans un environnement aqueux et stérile. Le tube d'alginate est installé dans la boîte de pétri selon le protocole décrit dans le chapitre précédent (partie 4.2.2.2.2). Une solution de bactéries est ensuite injectée dans le tube jusqu'à remplir entièrement le tube d'alginate. Le tube d'alginate est ensuite fermé de part et d'autre en pinçant le tube flexible à l'aide d'une pince. La boîte de pétri est remplie avec du milieu de culture pauvre en nutriments et est incubée à  $37^\circ\text{C}$  pendant une semaine, sans changement de milieu de culture et sans agitation. Au huitième jour, la photographie en figure 5.2.5a est prise. Nous n'observons aucune turbidité du milieu de culture ce qui signifie que le collage du tube d'alginate au capillaire de verre est bien hermétique et résiste jusqu'à huit jours dans du milieu M9. Lorsque nous regardons le tube en microscopie à épifluorescence (figure 5.2.5b), nous pouvons constater que la totalité de l'intérieur du tube d'alginate a été colonisé par des bactéries.

#### 5.2.2.2 Culture statique

La boîte de pétri modifiée ne permet pas d'agir sur le milieu externe au tube d'alginate ni son observation au microscope car elle est trop large et son épaisseur n'est pas compatible avec la distance de travail des objectifs disponible. Nous avons donc créé une cellule en inox et un support adaptable sur un microscope grâce à laquelle il est possible d'observer la croissance bactérienne dans un tube d'alginate. Une première expérience similaire à l'expérience précédente est pratiquée dans cette cellule afin d'en

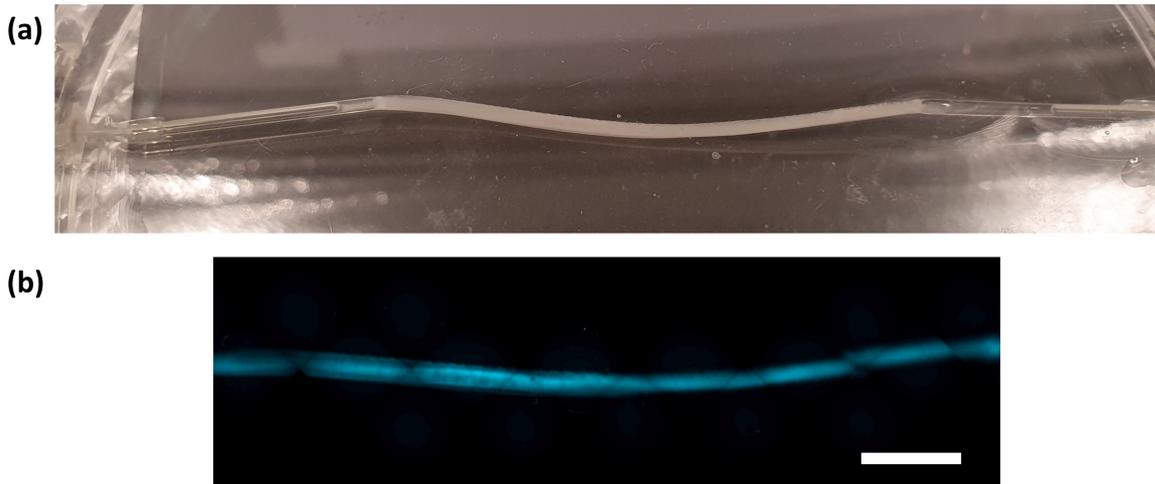


FIGURE 5.2.5 – Tube d'alginate colonisé par des bactéries *E. coli* PBR322 fluorescente. (a) est une photographie et (b) est une image de microscopie brochée. La barre d'échelle mesure 1 cm.

vérifier la stérilité. En effet, la cellule en inox ne peut pas être autoclavée car la lame de verre collée risque de se fissurer à cause de la dilatation causée par la chaleur. Cette expérience préliminaire confirme que la cellule est capable de maintenir des conditions stériles pendant huit jours.

Avant de pouvoir cultiver des bactéries dans notre bioréacteur, nous devons tout d'abord les caractériser afin de comprendre leur comportement dans des conditions favorables à leur croissance. Dans un premier temps, une bactérie fluorescente (PBR322) a été utilisée afin de faciliter leur observation et pouvoir distinguer facilement la présence de contamination microbienne (non fluorescentes). La prolifération des bactéries est déterminée par une mesure de turbidité à l'aide de la densité optique à 600 nm ( $OD_{600}$ ). On obtient alors une courbe exponentielle qu'il est possible de linéariser en passant au logarithme népérien. À l'aide de la partie linéaire des courbes de croissance déterminées en culture liquide (figure 5.2.6), correspondant à la phase de croissance exponentielle, nous pouvons déterminer le taux de croissance des bactéries  $\mu_{max}$  qui est le nombre de divisions par unité de temps. Le temps de génération  $G$ , qui correspond au temps nécessaire au dédoublement de la population, peut être obtenu par le calcul de la pente

$$\mu_{max} = \frac{\ln(OD_{600\_2}) - \ln(OD_{600\_1})}{t_2 - t_1}.$$

Si l'on considère que  $G = t_2 - t_1$ , alors  $OD_{600\_2} = 2 OD_{600\_1}$  et donc  $\ln(OD_{600\_2}) = \ln(2 OD_{600\_1})$

$$\mu_{max} = \frac{\ln(2 OD_{600\_1}) - \ln(OD_{600\_1})}{G},$$

## 5.2. APPLICATION DU BIORÉACTEUR TUBULAIRE À BASE D'HYDROGEL101

qui se simplifie donc en

$$\mu_{max} = \frac{\ln(2)}{G}$$

Le temps de génération ainsi calculé est de 3 heures pour la souche UMN026 cultivée à 30°C dans du M9 riche en nutriments, et de 3,8 et 5,5 heures pour la souche PRB322 cultivés à 37°C respectivement dans du M9 pauvre et riche en nutriments.

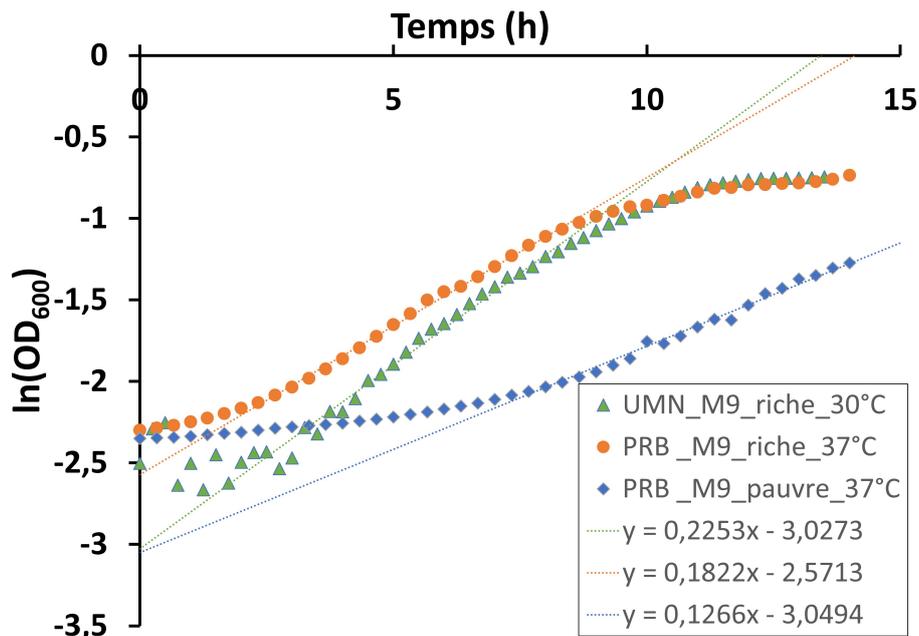


FIGURE 5.2.6 – Courbe de croissance des souches d'*E. coli* UMN026 et PBR322 et les régressions linéaires de la partie exponentielle de la courbe associées.

Les bactéries *E. coli* PRB322 cultivées dans un milieu riche en nutriments sont ensuite ensemencées dans un tube d'alginate par l'injection d'un millilitre d'une solution de bactéries à  $\text{OD}_{600} = 0,1$ , soit d'environ  $8 \cdot 10^8$  bactéries (figure 5.2.7a). Nous observons dans un premier temps une phase de sédimentation des bactéries qui est suivie par une phase de croissance (figure 5.2.7b). En effet, puisqu'il n'y a pas d'agitation et le milieu de culture est moins dense que les bactéries, les bactéries vont sédimenter. Ensuite, à 65 heures de culture, nous observons l'apparition de bulles d'air dans le milieu externe.

La culture statique de bactéries dans un tube d'hydrogel permet l'observation de la croissance bactéries *E. coli* PRB322 pendant au moins 65 heures. La durée de culture ne semble pas être conditionnée par la stabilité de l'hydrogel mais plutôt par le nombre de bactéries. En effet, au-delà d'un certain nombre de bactéries dans le système, il va y avoir une accumulation de gaz (figure 5.2.7c). Puisque *E. coli* est une bactérie

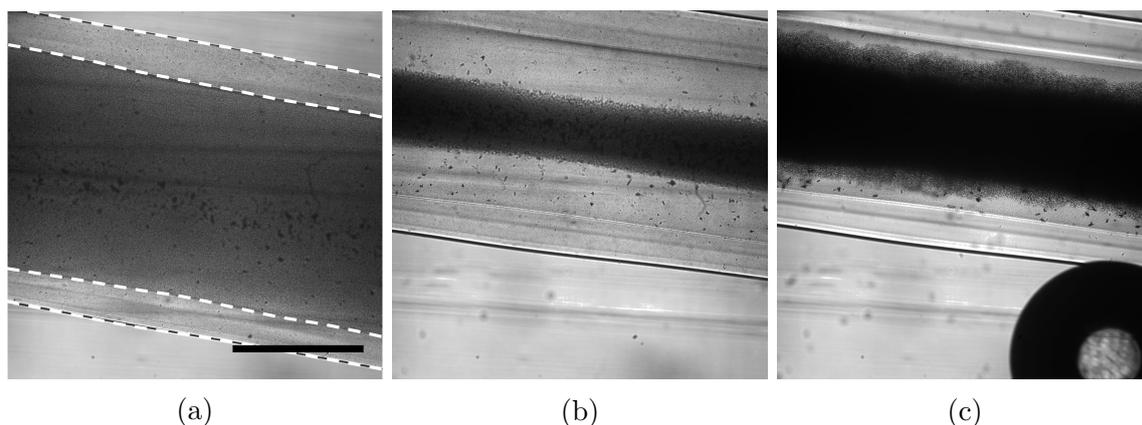


FIGURE 5.2.7 – Images obtenues par microscopie optique d'un tube d'alginateensemencé à  $OD_{600} = 0,1$  de bactéries PBR322 à (a)  $t=0$  h, (b)  $t=7$  h et (c)  $t=65$  h. Les bactéries sont cultivées dans le milieu M9 riche en nutriments et à  $37^{\circ}\text{C}$ . La paroi du tube est délimitée par des traits pointillés blancs et la barre d'échelle représente 1 mm.

anaérobie facultative, elle respire afin de produire de l'énergie : elle a donc besoin de  $\text{O}_2$  et d'une source de carbone qu'elle transforme en  $\text{CO}_2$ . Si la source de carbone est le glucose, la bactérie est capable de produire 6 molécules de  $\text{CO}_2$  : une par atome de carbone contenu dans la molécule de glucose. Ainsi, la mesure de la quantité de glucose consommée, permettrait de déterminer la quantité de  $\text{CO}_2$  produite. Lorsque la quantité de  $\text{CO}_2$  dépasse le seuil de solubilité dans l'eau (de l'ordre de 0,1 % à  $30^{\circ}\text{C}$  et à pression atmosphérique [102]), des bulles d'air nucléent et augmentent de volume. Pour prévenir ce problème, nous proposons d'ajouter un flux dans la phase externe afin d'aider à évacuer le gaz dans la partie 5.2.2.2.1.

Nous nous intéressons maintenant à savoir si la bactérie est capable d'adhérer à l'hydrogel. Pour ce faire, nous rinçons le tube d'alginate jusqu'à ne plus observer de fluorescence dans le tube, puis nous remplaçons le milieu de culture de la cellule. Nous observons qu'il y a de nombreuses particules de précipités présents dans le tube d'alginate qui sont des cristaux de phosphate de calcium qui résultent de la précipitation des sels présents dans le milieu de culture. Lors de la repousse, les bactéries paraissent principalement nucléées depuis ces précipités. Ainsi, si les bactéries sont capables de coloniser le tube de nouveau, ce n'est pas parce qu'elles sont adsorbées sur l'hydrogel, mais parce qu'elles le sont sur les cristaux de phosphate de calcium. Puisque que le calcium n'est présent qu'à une concentration de moins de 1 mM dans le milieu de culture, contre presque 70 mM d'ions  $\text{PO}_4^{3-}$ , la précipitation consomme la totalité du calcium. Malgré cela, les bactéries sont capables de proliférer. Le calcium n'est donc pas nécessaire et il sera retiré de la formulation du milieu de culture pour les expériences suivantes, afin d'empêcher la formation de précipités.

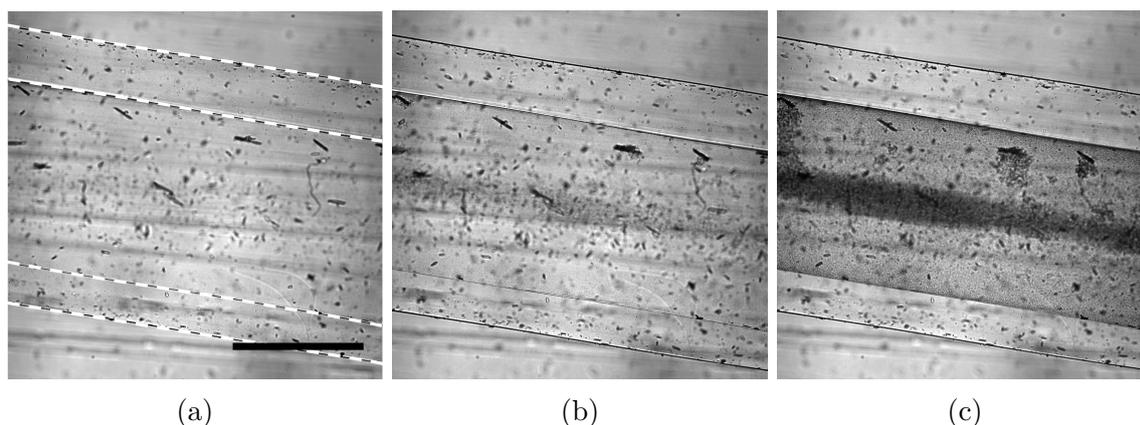


FIGURE 5.2.8 – Images obtenues par microscopie optique d'un tube d'alginate après rinçage complet du tube en figure 5.2.7 à (a)  $t=0$  h, (b)  $t=7$  h et (c)  $t=14$  h de repousse. La paroi du tube est délimitée par des traits pointillés blancs et la barre d'échelle représente 1 mm.

#### 5.2.2.2.1 Optimisation du protocole de culture statique

Afin de diminuer le temps nécessaire pour l'expérience, la souche utilisée maintenant est la souche UMN026 qui a un taux de croissance plus élevé que les bactéries PBR322 (figure 5.2.6). De plus, afin de limiter l'accumulation de  $\text{CO}_2$ , un flux est implémenté dans les canaux périphériques de la cellule. Ce flux est composé de deux injections de milieu de culture de part et d'autre du tube d'hydrogel à un débit de  $2 \text{ ml h}^{-1}$  chacune. De façon similaire à l'expérience précédente, les bactéries sédimentent avant de proliférer (figure 5.2.9b) et remplir le tube (figure 5.2.9c). Après 10 h de culture, une bulle d'air apparaît et après deux heures, provoque un éclatement du tube d'alginate, indiqué par la fuite des bactéries (figure 5.2.9d).

Une courbe de croissance a été estimée par analyse d'intensité de l'image sur deux zones : au centre et sur le côté du tube (figure 5.2.10b). Lorsque nous comparons la courbe obtenue par la culture le tube d'alginate (figure 5.2.10b) et celle obtenue par la culture en milieu liquide (figure 5.2.6), nous remarquons qu'un plateau est atteint plus rapidement sur la courbe "centre" de la figure 5.2.10b. Cela peut être expliqué par la saturation de l'intensité des pixels sur les images. De plus, comme le système n'est pas sous agitation, les bactéries sédimentent. La population n'est donc pas homogène, rendant la mesure imprécise, en particulier sur le côté du tube. Afin d'obtenir de meilleurs résultats quantitatifs, la supplémentation du le milieu de culture de 20 % de Nycodenz AG® (Axis-Shield, ProteoGenix), une petite molécule résistante à la dégradation bactérienne et largement utilisée en tant que modificateur de densité, permettrait d'augmenter la densité du milieu de culture à 1,1 soit la densité de *E.*

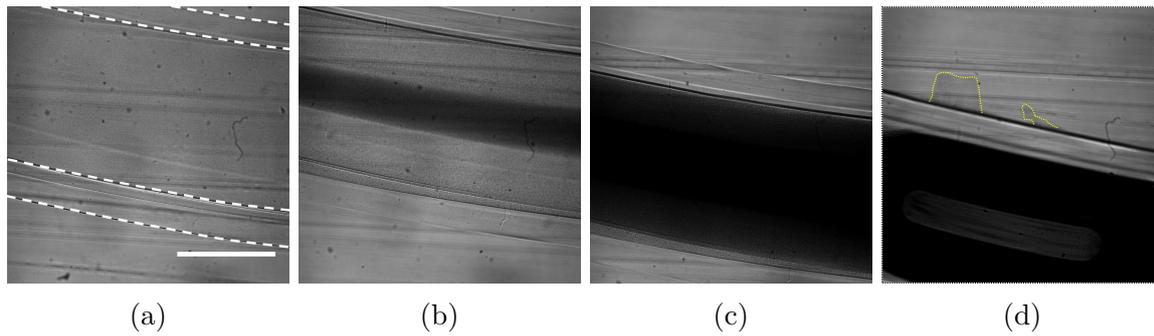


FIGURE 5.2.9 – Images obtenues par microscopie optique d'un tube d'alginateensemencé à  $OD_{600} = 0,31$  de bactéries UMN026 à (a)  $t=0$  h, (b)  $t=3,5$  h, (c)  $t=7,5$  h et (d)  $t=12$  h. Les bactéries sont cultivées dans le milieu M9 riche en nutriments et à  $30^{\circ}\text{C}$ . Les pointillés jaunes sur la figure (d) montrent la fuite de bactéries du tube. La paroi du tube est délimitée par des traits pointillés blancs et la barre d'échelle représente 1 mm.

*coli* [103] et ainsi éviter leur sédimentation. De plus, pour associer cette courbe de croissance à une quantité de bactéries, il faudrait effectuer un rinçage complet du tube et faire un comptage des bactéries ainsi obtenues à différents temps.

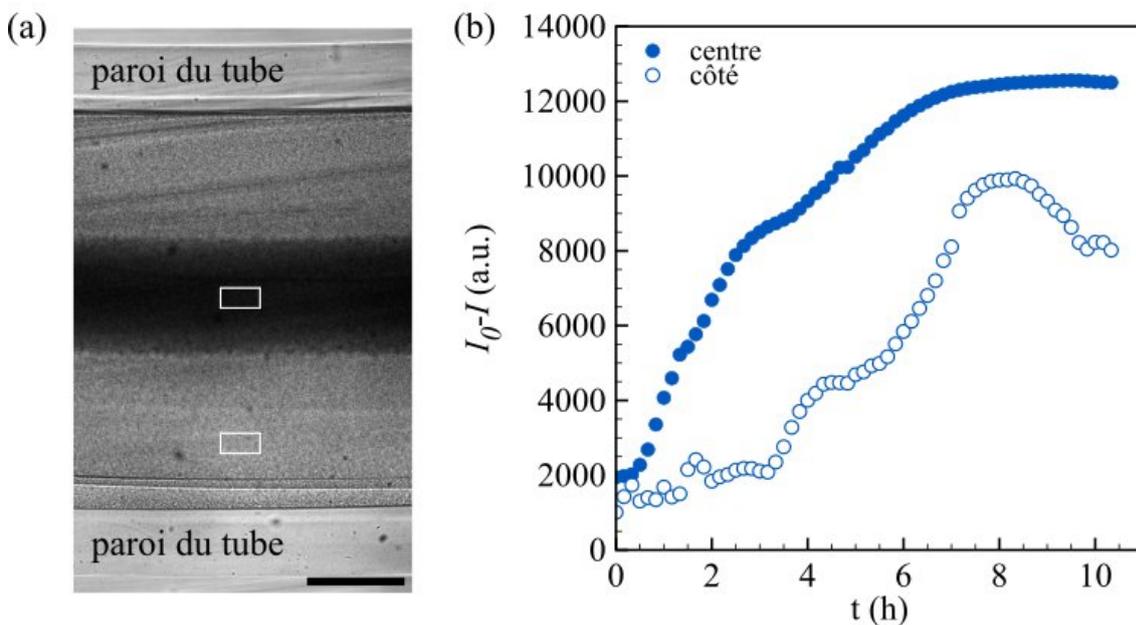


FIGURE 5.2.10 – Tube d'alginate colonisé par des bactéries *E. coli*. (a) est une image de microscopie et (b) est une courbe de l'absorbance au cours du temps. La barre d'échelle mesure 1 cm.

L'apparition des bulles d'air est un problème car si elle nucléent dans le tube d'alginate, elles peuvent grandir jusqu'à occuper tout l'espace du tube d'alginate (figure

## 5.2. APPLICATION DU BIORÉACTEUR TUBULAIRE À BASE D'HYDROGEL105

5.2.11a) et provoquer des fissures dans le tube d'hydrogel si ce dernier possède déjà des fragilités. La mesure de l'augmentation du volume de la bulle (figure 5.2.11b), donne des informations sur le métabolisme des bactéries puisque la production de gaz est le résultat de ce métabolisme, indiquant que les bactéries sont vivantes. Andersen et al. ont montré que lorsque les bactéries ont pour seule source de carbone le glucose, durant la phase de croissance exponentielle, la consommation en  $O_2$  est égale à la production de  $CO_2$  et peut atteindre 20 mmol par heure et par gramme de masse sèche de bactérie [104]. Dans l'optique de maintenir l'intégrité du tube d'hydrogel, il pourrait être intéressant d'implémenter un flux de milieu de culture à l'intérieur du tube afin d'évacuer une partie des métabolites tel un bioréacteur en mode "fed-batch" ou culture continue.

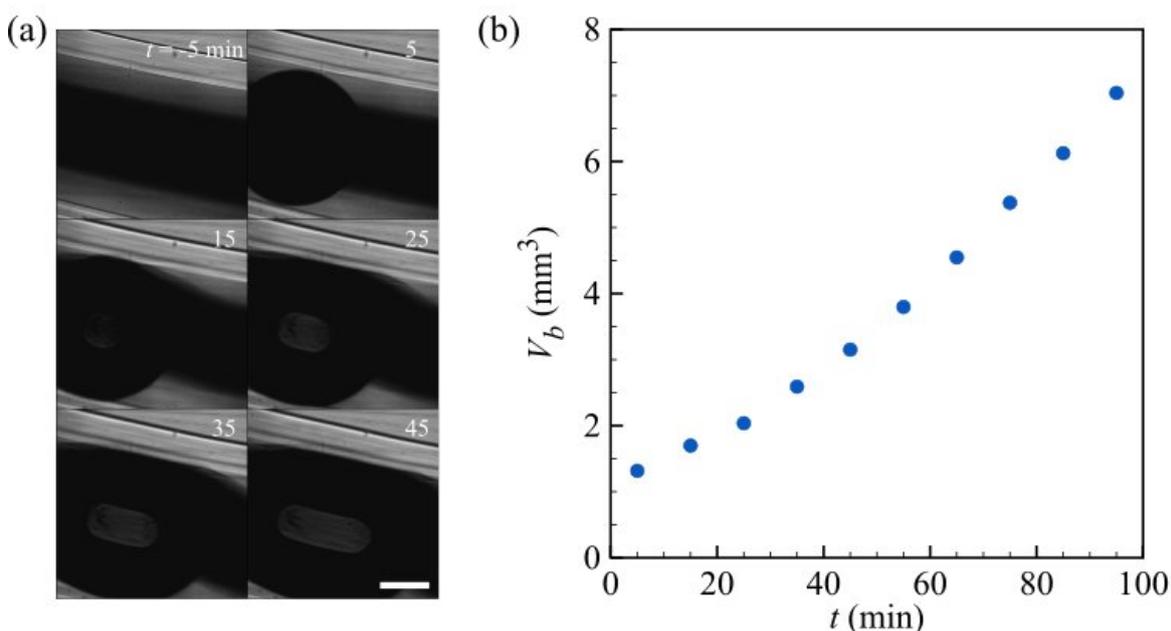


FIGURE 5.2.11 – (a) Images obtenues par microscopie optique d'un tube d'alginate ensemencé à  $OD_{600} = 0,31$  de bactéries UMN026 et (b) représentation graphique de la croissance de la bulle en fonction du temps.  $t=0$  min correspond à  $t=10$  h de culture en temps absolu. Les bactéries sont cultivées dans le milieu M9 riche en nutriments et à  $30^\circ C$ . La barre d'échelle représente 1 mm.

### 5.2.3 Conclusion et perspectives

Ces résultats montrent qu'il est possible de faire proliférer des bactéries dans le bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel que nous avons conçu pendant quelques jours. Ce système tel qu'il est aujourd'hui ne semble pas adapté à la production de biomasse.

En effet, nous sommes incapables de limiter la production de gaz et donc la nucléation de bulles d'air dans le tube d'alginate quand la population bactérienne devient trop importante. L'existence d'un écoulement au sein du tube d'alginate ainsi qu'à l'extérieur du tube pourrait être une solution. Le surplus de gaz sera donc évacué, maintenant le système sous le seuil de solubilité du  $\text{CO}_2$ .

Le bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel semble donc être un outil plus adapté à l'étude des bactéries plutôt qu'à la production de biomasse. En se basant sur le microbiote intestinal, il semble intéressant de mettre en place un bioréacteur dont l'environnement change le long du tube. La mise en place d'un tel chémostat peut permettre l'étude de l'adaptabilité des micro-organismes face à des stress tels que la présence en quantité croissante d'antibiotiques ou bien décroissante de nutriments ou en oxygène. Ces gradients chimiques seront implémentés dans la cellule grâce à un mécanisme de convection-diffusion expliqué en partie 5.2.1.3.2.

Une bactérie *E. coli* ne possédant pas de flagelle est un bâtonnet mesurant environ  $3,2 \mu\text{m}$  de long avec un diamètre d'environ  $0,9 \mu\text{m}$ . Un coefficient de diffusion moyen de  $D = 1,7 \cdot 10^{-13} \text{m}^2/\text{s}$  a été mesuré [105]. Dans une culture planctonique, sans formation de biofilm, si la population bactérienne peut être maintenue comme une particule colloïdale en suspension, il existe une très fine couche proche de la paroi du tube d'alginate où le nombre de Péclet local est inférieur à 1. Ainsi, dans cette situation, la diffusion l'emporte et les particules présentes dans cette couche ne seront que très peu affectées par le transport convectif. Cependant, si les particules diffusent hors de cette couche, elles seront emportées dans la direction du flux. Les bactéries pouvant se diviser, le maintien de la population bactérienne exige que le temps de division de la bactérie soit inférieur au temps de résidence de la bactérie dans cette très fine couche afin qu'une bactérie ne soit pas évacuée avant de s'être divisée. Il serait donc possible d'établir un flux continu dans le tube d'alginate sans pour autant chasser toutes les bactéries qui y sontensemencées, permettant la sélection selon le temps de division des bactéries qui peut être modulé selon la concentration d'une molécule bénéfique (ex : glucose) ou toxique (ex : antibiotique).

La formation d'un biofilm sur l'hydrogel permettrait elle aussi de maintenir les bactéries dans le tube en présence de flux. Nous avons vu dans les expériences de culture en tube d'alginate que *E. coli* n'adhère pas sur l'hydrogel, ce qui est nécessaire car c'est la première étape de la formation d'un biofilm. La fonctionnalisation de l'alginate par adsorption de poly-l-lysine permettrait l'adhérence des bactéries [106] par l'interaction électrostatique entre la capsule bactérienne contenant des polysaccharides anioniques et la poly-l-lysine positivement chargée.

# Chapitre 6

## Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons conçu et appliqué un bioréacteur tubulaire en hydrogel à la culture de bactéries. Un tel système permet d'imiter des structures tubulaires naturelles comme les intestins qui sont formés par une monocouche cellulaire ayant des fonctions d'absorption par diffusion comparables à une membrane semi-perméable. L'intestin étant un organe très complexe autant par sa diversité et structure cellulaires que par ses fonctions, il sera modélisé par un tube d'hydrogel permettant la culture de bactéries et sur lequel il est possible d'imposer un gradient de concentration chimique.

Des tubes d'hydrogel sont formés par un procédé millifluidique de co-extrusion à bas débit d'une solution visqueuse de polymère d'alginate et d'une solution interne aqueuse dans un bain gélifiant contenant des cations divalents qui est placé à une distance variable de la buse d'extrusion. La co-extrusion d'une phase externe de solution d'alginate et de phase interne de solution aqueuse dans un bain forme un pont liquide lorsque la goutte de fluide formée au niveau de la buse est stabilisée par la présence d'une surface libre à une hauteur suffisamment faible. Lorsque ce bain est composé d'eau, nous n'observons pas la formation d'un tube alors que si un agent gélifiant tel que le calcium est ajouté, un tube se forme. De plus, selon la hauteur d'extrusion, et donc le diamètre du cou du pont liquide, il est possible de moduler le diamètre externe du tube. Ces résultats suggèrent donc que la formation du tube résulte d'une compétition entre l'étalement de la solution d'alginate à la surface libre du bain et de la transition sol-gel induite par la diffusion des cations depuis le bain. Par ailleurs, si la solution interne ne contient pas ou une faible concentration de cations, nous observons une déstabilisation de l'interface interne du tube causant respectivement l'établissement d'un diamètre interne inhomogène ou un flambage. L'ajout d'une quantité de calcium permettant la gélification d'une couche suffisamment épaisse permet de palier

ce problème et la formation d'un tube ayant un diamètre externe observé dans le bain qui est celui de la buse d'extrusion.

Le troisième chapitre présente tout d'abord un protocole pour le montage par adhésion des tubes d'alginate sur des capillaires en verre, fonctionnalisés par un poly-électrolyte positivement chargé, pour faciliter la manipulation des tubes et permettre leur perfusion. Par la suite, la culture de bactéries nécessitant de milieux de cultures qui peuvent influencer la stabilité de l'hydrogel, les propriétés physico-chimiques de l'hydrogel sont caractérisées par l'étude de la stabilité de l'hydrogel d'alginate de calcium. L'alginate de calcium se dissout en présence de sodium car par leur affinité supérieure avec l'alginate, ils provoquent le phénomène de 'unzipping' de la structure de boîte à oeuf. La stabilité de l'alginate de baryum est aussi étudiée car le baryum possède une meilleure affinité pour l'alginate que le calcium. L'utilisation du baryum pour gélifier l'alginate permet d'obtenir un hydrogel stable dans des conditions physiologiques de culture microbienne mais il a un aspect hétérogène, rendant alors les tubes non fonctionnels car ils sont rugueux et ne sont pas transparents. Cependant, grâce à un échange ionique par du baryum, il est possible de stabiliser les tubes d'alginate de calcium qui gardent leur transparence et résistent aux conditions de culture biologique.

Les tubes d'alginate sont ensuite mis à l'essai dans le quatrième chapitre de ce manuscrit. Dans un premier temps, les tubes d'alginate sont montés dans une boîte de pétri modifiée permettant la culture de bactéries dans le tube d'alginate dans des conditions stériles jusqu'à huit jours sans changement de milieu. Un système plus complexe compatible avec une observation au microscope a été mis en place. Cette cellule de flux possédant une fenêtre d'observation et des canaux d'entrées et de sortie, permet la perfusion du tube d'alginate mais également d'induire un écoulement du milieu de culture extérieur au contact de la membrane semi-perméable que constitue l'hydrogel. Un tel système permet la culture de bactéries sur un temps plus ou moins long selon le taux de croissance de la bactérie. En effet, au bout d'un certain temps, il se forme des bulles d'air qui résultent d'une mauvaise évacuation du  $\text{CO}_2$  produit par le métabolisme microbien.

Ces résultats montrent qu'il est possible de faire proliférer des bactéries dans le bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel que nous avons conçu. Ce système tel qu'il est aujourd'hui ne semble pas adapté à la production de biomasse. En effet, nous sommes incapables de limiter la production de gaz et donc la nucléation de bulles d'air dans le tube d'alginate quand la population bactérienne devient trop importante. L'existence d'un écoulement au sein du tube d'alginate ainsi qu'à l'extérieur du tube pourrait être une solution. Le surplus de gaz sera donc évacué, maintenant le système sous le seuil de solubilité du  $\text{CO}_2$ . L'établissement d'un gradient de concentration chimique diffusif

grâce aux écoulements imposés dans les canaux extérieurs permettra aussi d'étudier l'effet de la concentration en certains solutés sur l'adaptation des bactéries afin de mieux comprendre les différentes niches du système digestif.

Pour se rapprocher encore plus d'un modèle intestinal, il faut créer une monocouche de cellules intestinales sur le tube d'alginate. Or, les cellules de mammifères ne sont pas capables d'adhérer sur l'hydrogel d'alginate car sa surface ne présente pas de motifs d'adhésion cellulaire. Cependant, il est possible de fonctionnaliser l'alginate par le greffage d'un motif d'adhésion cellulaire, comme la séquence RGD, sur le carboxylate de l'alginate grâce à un couplage facilité par une activation par un carbodiimide, l'hydrogel ainsi fonctionnalisé permet la prolifération et la différenciation de cellules musculaires murines [107] mais aussi de cellules hépatiques [108]. Dans le cadre du bioréacteur qui a été élaboré dans cette thèse, une telle fonctionnalisation de l'hydrogel permettrait la croissance d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales, ce qui couplé à une co-culture de bactéries et la présence d'un gradient de concentration chimique, pourrait permettre de mieux imiter l'intestin.



# Bibliographie

- [1] J. L. Round and S. K. Mazmanian, “The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease,” *Nat Rev Immunol*, vol. 9, pp. 313–323, May 2009.
- [2] C. L. Hayes, J. Dong, H. J. Galipeau, J. Jury, J. McCarville, X. Huang, X.-Y. Wang, A. Naidoo, A. N. Anbazhagan, J. Libertucci, C. Sheridan, P. K. Dudeja, D. M. E. Bowdish, M. G. Surette, and E. F. Verdu, “Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis,” *Sci Rep*, vol. 8, p. 14184, Dec. 2018.
- [3] K. M. Maslowski and C. R. Mackay, “Diet, gut microbiota and immune responses,” *Nat Immunol*, vol. 12, pp. 5–9, Jan. 2011.
- [4] E. T. Hillman, H. Lu, T. Yao, and C. H. Nakatsu, “Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract,” *Microbes Environ*, vol. 32, pp. 300–313, Dec. 2017.
- [5] S. Jalili-Firoozinezhad, F. S. Gazzaniga, E. L. Calamari, D. M. Camacho, C. W. Fadel, A. Bein, B. Swenor, B. Nestor, M. J. Cronce, A. Tovaglieri, O. Levy, K. E. Gregory, D. T. Breault, J. M. S. Cabral, D. L. Kasper, R. Novak, and D. E. Ingber, “A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip,” *Nat Biomed Eng*, vol. 3, pp. 520–531, July 2019.
- [6] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, and D. E. Ingber, “Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow,” *Lab Chip*, vol. 12, p. 2165, Mar. 2012.
- [7] A. Bein, W. Shin, S. Jalili-Firoozinezhad, M. H. Park, A. Sontheimer-Phelps, A. Tovaglieri, A. Chalkiadaki, H. J. Kim, and D. E. Ingber, “Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine,” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 5, pp. 659–668, Jan. 2018.
- [8] P. Shah, J. V. Fritz, E. Glaab, M. S. Desai, K. Greenhalgh, A. Frachet, M. Niegowska, M. Estes, C. Jäger, C. Seguin-Devaux, F. Zenhausern, and P. Wilmes, “A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human–microbe interface,” *Nat Commun*, vol. 7, May 2016.

- [9] N. Bremond, E. Santanach-Carreras, L.-Y. Chu, and J. Bibette, “Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane : liquid pearls,” *Soft Matter*, vol. 6, pp. 2484–2488, May 2010.
- [10] F. Grelard, *Caractérisation géométrique d’organes tubulaires*. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, Dec. 2017.
- [11] C. Ternet and C. Kiel, “Signaling pathways in intestinal homeostasis and colorectal cancer : KRAS at centre stage,” *Cell Commun Signal*, vol. 19, p. 31, Dec. 2021.
- [12] A. Ootani, X. Li, E. Sangiorgi, Q. T. Ho, H. Ueno, S. Toda, H. Sugihara, K. Fujimoto, I. L. Weissman, M. R. Capecchi, and C. J. Kuo, “Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche,” *Nat. Med.*, vol. 15, pp. 701–706, June 2009.
- [13] D. Ramanan and K. Cadwell, “Intrinsic Defense Mechanisms of the Intestinal Epithelium,” *Cell Host Microbe*, vol. 19, pp. 434–441, Apr. 2016.
- [14] L. G. van der Flier and H. Clevers, “Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 71, pp. 241–260, Mar. 2009.
- [15] J. Cremer, I. Segota, C.-y. Yang, M. Arnoldini, J. T. Sauls, Z. Zhang, E. Gutierrez, A. Groisman, and T. Hwa, “Effect of flow and peristaltic mixing on bacterial growth in a gut-like channel,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, pp. 11414–11419, Oct. 2016.
- [16] G. Clarke, K. V. Sandhu, B. T. Griffin, T. G. Dinan, J. F. Cryan, and N. P. Hyland, “Gut Reactions : Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions,” *Pharmacol Rev*, vol. 71, p. 198, Apr. 2019.
- [17] B. Cabane and S. Hénon, *Liquides : solutions, dispersions, émulsions, gels*. Échelles, Paris : Belin, nouvelle éd. revue et augmentée ed., 2007.
- [18] A. S. Hoffman, “Hydrogels for biomedical applications,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, pp. 3–12, Jan. 2002.
- [19] X. Chen, B. D. Martin, T. K. Neubauer, R. J. Linhardt, J. S. Dordick, and D. G. Rethwisch, “Enzymatic and chemoenzymatic approaches to synthesis of sugar-based polymer and hydrogels,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 28, pp. 15–21, Jan. 1995.
- [20] N. Kashyap, N. Kumar, and M. N. V. R. Kumar, “Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications,” *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 22, no. 2, pp. 107–150, 2005.

- [21] N. Peppas, “Hydrogels in pharmaceutical formulations,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 50, pp. 27–46, July 2000.
- [22] K. Y. Lee and D. J. Mooney, “Hydrogels for tissue engineering,” *Chem Rev*, vol. 101, pp. 1869–1879, July 2001.
- [23] O. Wichterle and D. Lím, “Hydrophilic Gels for Biological Use,” *Nature*, vol. 185, pp. 117–118, Jan. 1960.
- [24] C.-C. Lin and K. S. Anseth, “PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine,” *Pharm Res*, vol. 26, pp. 631–643, Mar. 2009.
- [25] A. D. Augst, H. J. Kong, and D. J. Mooney, “Alginate Hydrogels as Biomaterials,” *Macromol. Biosci.*, vol. 6, pp. 623–633, Aug. 2006.
- [26] K. S. Anseth, C. N. Bowman, and L. Brannon-Peppas, “Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination,” *Biomaterials*, vol. 17, pp. 1647–1657, Sept. 1996.
- [27] W. Bouhleb, *Procédé d’encapsulation à base d’hydrogels pour le développement de micro-tissus cellulaires*. Thèse de doctorat, Sorbonne Université, Nov. 2018.
- [28] H. Doméjean, M. de la Motte Saint Pierre, A. Funfak, N. Atrux-Tallau, K. Alessandri, P. Nassoy, J. Bibette, and N. Bremond, “Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3D cell culture,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 1, pp. 110–119, 2017.
- [29] K. Alessandri, B. R. Sarangi, V. V. Gurchenkov, B. Sinha, T. R. Kießling, L. Fetter, F. Rico, S. Scheuring, C. Lamaze, A. Simon, S. Geraldo, D. Vignjevic, H. Doméjean, L. Rolland, A. Funfak, J. Bibette, N. Bremond, and P. Nassoy, “Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 110, pp. 14843–14848, Sept. 2013.
- [30] L. Rolland, E. Santanach-Carreras, T. Delmas, J. Bibette, and N. Bremond, “Physicochemical properties of aqueous core hydrogel capsules,” *Soft Matter*, vol. 10, pp. 9668–9674, Dec. 2014.
- [31] J. C. Athas, C. P. Nguyen, S. Kummar, and S. R. Raghavan, “Cation-induced folding of alginate-bearing bilayer gels : an unusual example of spontaneous folding along the long axis,” *Soft Matter*, vol. 14, no. 14, pp. 2735–2743, 2018.
- [32] Z. Li, S. Huang, Y. Liu, B. Yao, T. Hu, H. Shi, J. Xie, and X. Fu, “Tuning Alginate-Gelatin Bioink Properties by Varying Solvent and Their Impact on Stem Cell Behavior,” *Sci Rep*, vol. 8, p. 8020, Dec. 2018.

- [33] A. Ghanizadeh Tabriz, C. G. Mills, J. J. Mullins, J. A. Davies, and W. Shu, "Rapid Fabrication of Cell-Laden Alginate Hydrogel 3D Structures by Micro Dip-Coating," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, 2017.
- [34] I. Holland, J. Logan, J. Shi, C. McCormick, D. Liu, and W. Shu, "3D biofabrication for tubular tissue engineering," *Bio-des. Manuf.*, vol. 1, pp. 89–100, June 2018.
- [35] Y. Zhang, Y. Yu, and I. T. Ozbolat, "Direct Bioprinting of Vessel-Like Tubular Microfluidic Channels," *J Nanotechnol Eng Med*, vol. 4, pp. 0210011–0210017, May 2013.
- [36] W. Jia, P. S. Gungor-Ozkerim, Y. S. Zhang, K. Yue, K. Zhu, W. Liu, Q. Pi, B. Byambaa, M. R. Dokmeci, S. R. Shin, and A. Khademhosseini, "Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink," *Biomaterials*, vol. 106, pp. 58–68, Nov. 2016.
- [37] C. B. Weinberg and E. Bell, "A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells," *Science*, vol. 231, pp. 397–400, Jan. 1986.
- [38] E. Jablonka, "Epigenetic inheritance and plasticity : The responsive germline," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 111, no. 2, pp. 99–107, 2013.
- [39] K. Rogers and R. J. Kadner, "Bacteria."
- [40] H. Bachmann, M. Fischlechner, I. Rabbers, N. Barfa, F. Branco dos Santos, D. Molenaar, and B. Teusink, "Availability of public goods shapes the evolution of competing metabolic strategies," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 14302–14307, Aug. 2013.
- [41] G. D. Najafpour, *Biochemical engineering and biotechnology*. Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2015. OCLC : 1281801081.
- [42] B. Roellinger, *De nouveaux hydrogels composites pour la production et le stockage énergétique*. Thèse de doctorat, Paris Sciences et Lettres (ComUE), Oct. 2019.
- [43] M. Duliège, *Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique*. Thèse de doctorat, UPMC - Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, Jan. 2017.
- [44] R. N. Singh and S. Sharma, "Development of suitable photobioreactor for algae production – A review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, no. 4, pp. 2347–2353, 2012. Publisher : Elsevier.
- [45] S. D. Naghib, F. P. Di Maio, L. De Bartolo, E. Curcio, and A. Di Renzo, "Automation and control system for fluid dynamic stability in hollow-fiber membrane bioreactor for cell culture," *J. Chem. Technol. Biotechnol*, vol. 93, pp. 710–719, Mar. 2018.

- [46] D. Sheyn, D. Cohn-Yakubovich, S. Ben-David, S. De Mel, V. Chan, C. Hinojosa, N. Wen, G. A. Hamilton, D. Gazit, and Z. Gazit, “Bone-chip system to monitor osteogenic differentiation using optical imaging,” *Microfluid Nanofluid*, vol. 23, p. 99, July 2019.
- [47] J. C. Nawroth, C. Lucchesi, D. Cheng, A. Shukla, J. Ngyuen, T. Shroff, A. Varone, K. Karalis, H.-H. Lee, S. Alves, G. A. Hamilton, M. Salmon, and R. Villenave, “A Microengineered Airway Lung Chip Models Key Features of Viral-induced Exacerbation of Asthma,” *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 63, pp. 591–600, Nov. 2020.
- [48] K.-J. Jang, M. A. Otieno, J. Ronxhi, H.-K. Lim, L. Ewart, K. R. Kodella, D. B. Petropolis, G. Kulkarni, J. E. Rubins, D. Conegliano, J. Nawroth, D. Simic, W. Lam, M. Singer, E. Barale, B. Singh, M. Sonee, A. J. Streeter, C. Manthey, B. Jones, A. Srivastava, L. C. Andersson, D. Williams, H. Park, R. Barrile, J. Sliz, A. Herland, S. Haney, K. Karalis, D. E. Ingber, and G. A. Hamilton, “Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, p. eaax5516, Nov. 2019.
- [49] P. Stoodley, I. Dodds, J. D. Boyle, and H. M. Lappin-Scott, “Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure,” *J Appl Microbiol*, vol. 85 Suppl 1, pp. 19S–28S, Dec. 1998.
- [50] J. Teodósio, M. Simões, L. Melo, and F. Mergulhão, “Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow,” *Biofouling*, vol. 27, pp. 1–11, Jan. 2011.
- [51] W. Zhang, T. S. Sileika, C. Chen, Y. Liu, J. Lee, and A. I. Packman, “A novel planar flow cell for studies of biofilm heterogeneity and flow-biofilm interactions,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, pp. 2571–2582, Nov. 2011.
- [52] M. O. Pereira, M. Kuehn, S. Wuertz, T. Neu, and L. F. Melo, “Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 78, pp. 164–171, Apr. 2002.
- [53] R. Karande, B. Halan, A. Schmid, and K. Buehler, “Segmented flow is controlling growth of catalytic biofilms in continuous multiphase microreactors : Aqueous-Air Segmented Flow Biofilm Microreactor,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, pp. 1831–1840, Sept. 2014.
- [54] K. I. Draget, G. Skjåk-Bræk, and O. Smidsrød, “Alginate based new materials,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 21, pp. 47–55, Aug. 1997.

- [55] L. Rolland, *Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Nov. 2013.
- [56] A. Blandino, M. Macías, and D. Cantero, “Formation of calcium alginate gel capsules : Influence of sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 88, pp. 686–689, Jan. 1999.
- [57] J. Godefroid, *Gouttes de fluides complexes tombant dans un bain liquide : impact, relaxation et gélification*. Thèse de doctorat, Paris Sciences et Lettres (ComUE), Dec. 2019.
- [58] C. Ouwerx, N. Velings, M. M. Mestdagh, and M. A. V. Axelos, “Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations,” *Polymer Gels and Networks*, vol. 6, pp. 393–408, Oct. 1998.
- [59] K. I. Draget, O. Gåserød, I. Aune, P. O. Andersen, B. Storbakken, B. T. Stokke, and O. Smidsrød, “Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gels,” *Food Hydrocolloids*, vol. 15, no. 4, pp. 485–490, 2001.
- [60] K. Potter, B. J. Balcom, T. A. Carpenter, and L. D. Hall, “The gelation of sodium alginate with calcium ions studied by magnetic resonance imaging (MRI),” *Carbohydrate Research*, vol. 257, pp. 117–126, Apr. 1994.
- [61] K. DeFrates, R. Moore, J. Borgesi, G. Lin, T. Mulderig, V. Beachley, and X. Hu, “Protein-Based Fiber Materials in Medicine : A Review,” *Nanomaterials*, vol. 8, p. 457, 2018.
- [62] J. Eggers and E. Villermaux, “Physics of Liquid Jets,” *Reports on Progress in Physics*, vol. 71, p. 036601, 2008.
- [63] S. J. Leib and M. E. Goldstein, “The generation of capillary instabilities on a liquid jet,” *J. Fluid Mech.*, vol. 168, p. 479, July 1986.
- [64] S. J. Leib and M. E. Goldstein, “Convective and absolute instability of a viscous liquid jet,” *Phys. Fluids*, vol. 29, no. 4, p. 952, 1986.
- [65] U. S. Sauter and H. W. Buggisch, “Stability of initially slow viscous jets driven by gravity,” *J. Fluid Mech.*, vol. 533, June 2005.
- [66] J. F. Padday and A. R. Pitt, “The stability of axisymmetric menisci,” *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, vol. 275, pp. 489–528, Dec. 1973.
- [67] B. Roman, C. Gay, and C. Clanet, “Pendulums, Drops and Rods : a physical analogy,” *arXiv :2006.02742 [cond-mat]*, June 2020. arXiv : 2006.02742.

- [68] J. Eggers, “Universal pinching of 3D axisymmetric free-surface flow,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 71, pp. 3458–3460, Nov. 1993.
- [69] F. T. Trouton, “On the coefficient of viscous traction and its relation to that of viscosity,” *Proc. R. Soc. Lond. A*, vol. 77, pp. 426–440, May 1906.
- [70] A. Martínez-Calvo, M. Rubio-Rubio, and A. Sevilla, “The nonlinear states of viscous capillary jets confined in the axial direction,” *J. Fluid Mech.*, vol. 834, pp. 335–358, Jan. 2018.
- [71] J. Sébilleau, L. Limat, and J. Eggers, “Flow separation from a stationary meniscus,” *J. Fluid Mech.*, vol. 633, pp. 137–145, Aug. 2009.
- [72] J. Sebilleau, L. Lebon, L. Limat, L. Quartier, and M. Receveur, “The dynamics and shapes of a viscous sheet spreading on a moving liquid bath,” *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 92, p. 14003, Oct. 2010.
- [73] E. Lancaster, C. Calladine, and S. Palmer, “Paradoxical buckling behaviour of a thin cylindrical shell under axial compression,” *International Journal of Mechanical Sciences*, vol. 42, pp. 843–865, 2000.
- [74] P. Mandal and C. R. Calladine, “Buckling of thin cylindrical shells under axial compression,” *International Journal of Solids and Structures*, vol. 37, no. 33, pp. 4509–4525, 2000.
- [75] B. Li, Y.-P. Cao, X.-Q. Feng, and H. Gao, “Mechanics of morphological instabilities and surface wrinkling in soft materials : a review,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 21, p. 5728, 2012.
- [76] J. R. Mitchell and J. M. V. Blanshard, “Rheological Properties of Alginate Gels,” *J Texture Studies*, vol. 7, pp. 219–234, Sept. 1976.
- [77] F. Dolati, Y. Yu, Y. Zhang, A. M. D. Jesus, E. A. Sander, and I. T. Ozbolat, “*In vitro* evaluation of carbon-nanotube-reinforced bioprintable vascular conduits,” *Nanotechnology*, vol. 25, p. 145101, Apr. 2014.
- [78] X. Zhao, N. Huebsch, D. J. Mooney, and Z. Suo, “Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks,” *J Appl Phys*, vol. 107, p. 063509, Mar. 2010.
- [79] C. Lee, J. Shin, J. S. Lee, E. Byun, J. H. Ryu, S. H. Um, D.-I. Kim, H. Lee, and S.-W. Cho, “Bioinspired, Calcium-Free Alginate Hydrogels with Tunable Physical and Mechanical Properties and Improved Biocompatibility,” *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 2004–2013, June 2013.
- [80] F. Zhang, K. Sautter, A. M. Larsen, D. A. Findley, R. C. Davis, H. Samha, and M. R. Linford, “Chemical Vapor Deposition of Three Aminosilanes on Silicon

- Dioxide : Surface Characterization, Stability, Effects of Silane Concentration, and Cyanine Dye Adsorption,” *Langmuir*, vol. 26, pp. 14648–14654, Sept. 2010.
- [81] A. Macieira-Coelho and S. Avrameas, “Modulation of Cell Behavior In Vitro by the Substratum in Fibroblastic and Leukemic Mouse Cell Lines,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 69, pp. 2469–73, Oct. 1972.
- [82] J. Taylor, “The Use of Poly-L-lysine as an Adhesive in Scanning Electron Microscopy,” *Microscopy Today*, vol. 16, pp. 52–53, Nov. 2008.
- [83] J.-H. Choi, S.-O. Kim, E. Linaryd, E. C. Dreaden, V. P. Zhdanov, P. T. Hammond, and N.-J. Cho, “Influence of pH and Surface Chemistry on Poly-L-lysine Adsorption onto Solid Supports Investigated by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, pp. 10554–10565, Aug. 2015.
- [84] T. Baumberger and O. Ronsin, “Cooperative Effect of Stress and Ion Displacement on the Dynamics of Cross-Link Unzipping and Rupture of Alginate Gels,” *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1571–8, June 2010.
- [85] S. K. Pandey, C. R. Suri, M. Chaudhry, R. P. Tiwari, and P. Rishi, “A gold nanoparticles based immuno-bioprobe for detection of Vi capsular polysaccharide of Salmonella enterica serovar Typhi,” *Mol. BioSyst.*, vol. 8, no. 7, p. 1853, 2012.
- [86] S. K. Bajpai and S. Sharma, “Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. 59, pp. 129–140, May 2004.
- [87] A. Haug, O. Smidsrød, B. Larsen, S. Gronowitz, R. A. Hoffman, and A. Westerdahl, “The Effect of Divalent Metals on the Properties of Alginate Solutions. II. Comparison of Different Metal Ions.,” *Acta Chem. Scand.*, vol. 19, pp. 341–351, 1965.
- [88] L. Mottet, *Hydrogel composite conducteur pour l’encapsulation de bactéries électroactives*. Thèse de doctorat, Paris 6, Dec. 2015.
- [89] A. Mørch, I. Donati, B. L. Strand, and G. Skjåk-Bræk, “Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on Alginate Microbeads,” *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 1471–1480, May 2006.
- [90] M. Dayeh, M. Ammar, and M. Al-Ghoul, “Transition from rings to spots in a precipitation reaction–diffusion system,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 104, pp. 60034–60038, 2014.

- [91] V. Vitagliano and P. A. Lyons, "Diffusion Coefficients for Aqueous Solutions of Sodium Chloride and Barium Chloride," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, pp. 1549–1552, Apr. 1956.
- [92] K. J. Locey and J. T. Lennon, "Scaling laws predict global microbial diversity," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, pp. 5970–5975, May 2016.
- [93] M. Parmentier, *Development of a microbiologic module for hydrobiogeochemical modelling and applications on arsenic mobility*. Thèse de doctorat, Ecole des Mines de Paris, Oct. 2006.
- [94] T. Coenye and H. J. Nelis, "In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation," *J. Microbiol. Methods*, vol. 83, pp. 89–105, Nov. 2010.
- [95] Y. D. Tremblay, S. Hathroubi, and M. Jacques, "Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique," *Can J Vet Res*, vol. 78, pp. 110–116, Apr. 2014.
- [96] K. Muffler and R. Ulber, eds., *Productive Biofilms*. No. 146 in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Cham : Springer International Publishing : Imprint : Springer, 1st ed. 2014 ed., 2014.
- [97] J. C. Stearns, M. D. J. Lynch, D. B. Senadheera, H. C. Tenenbaum, M. B. Goldberg, D. G. Cvitkovitch, K. Croitoru, G. Moreno-Hagelsieb, and J. D. Neufeld, "Bacterial biogeography of the human digestive tract," *Sci Rep*, vol. 1, p. 170, Dec. 2011.
- [98] A. E. Kamholz, B. H. Weigl, B. A. Finlayson, and P. Yager, "Quantitative Analysis of Molecular Interaction in a Microfluidic Channel : The T-Sensor," *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 5340–5347, Dec. 1999.
- [99] A. E. Kamholz and P. Yager, "Theoretical Analysis of Molecular Diffusion in Pressure-Driven Laminar Flow in Microfluidic Channels," *Biophysical Journal*, vol. 80, pp. 155–160, Jan. 2001.
- [100] R. F. Ismagilov, A. D. Stroock, P. J. A. Kenis, G. Whitesides, and H. A. Stone, "Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 76, pp. 2376–2378, Apr. 2000.
- [101] J. K. Gladden and M. Dole, "Diffusion in Supersaturated Solutions. II. Glucose Solutions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 75, pp. 3900–3904, Aug. 1953.
- [102] W. S. Dodds, L. F. Stutzman, and B. J. Sollami, "Carbon Dioxide Solubility in Water," *Ind. Eng. Chem. Chem. Eng. Data Series*, vol. 1, pp. 92–95, Jan. 1956.

- [103] W. W. Baldwin, R. Myer, N. Powell, E. Anderson, and A. L. Koch, "Buoyant density of *Escherichia coli* is determined solely by the osmolarity of the culture medium," *Arch Microbiol*, vol. 164, pp. 155–157, Aug. 1995.
- [104] K. B. Andersen and K. von Meyenburg, "Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration?," *J Bacteriol*, vol. 144, pp. 114–123, Oct. 1980.
- [105] S. Tavaddod, M. A. Charsooghi, F. Abdi, H. R. Khalesifard, and R. Golestanian, "Probing passive diffusion of flagellated and deflagellated *Escherichia coli*," *Eur Phys J E Soft Matter*, vol. 34, p. 16, Feb. 2011.
- [106] S. E. Cowan, D. Liepmann, and J. D. Keasling, "Development of engineered biofilms on poly- L-lysine patterned surfaces," *Biotechnology Letters*, vol. 23, pp. 1235–1241, Aug. 2001.
- [107] J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney, "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 45–53, Jan. 1999.
- [108] B. C. U. Tai, C. Du, S. Gao, A. C. A. Wan, and J. Y. Ying, "The use of a polyelectrolyte fibrous scaffold to deliver differentiated hMSCs to the liver," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 48–57, Jan. 2010.

