



**HAL**  
open science

# Encapsulation de bactéries par freeze-casting : développement de nouveaux biomatériaux pour la bioremédiation

Corentin Eschenbrenner

## ► To cite this version:

Corentin Eschenbrenner. Encapsulation de bactéries par freeze-casting : développement de nouveaux biomatériaux pour la bioremédiation. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS137 . tel-03813769

**HAL Id: tel-03813769**

**<https://theses.hal.science/tel-03813769v1>**

Submitted on 13 Oct 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.

# Sorbonne Université

École doctorale 397 – Physique et Chimie des Matériaux

*Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris*

## **Encapsulation de bactéries par congélation directionnelle : développement de nouveaux biomatériaux pour la bioremédiation**

Par **Corentin ESCHENBRENNER**

Thèse de doctorat Physique et Chimie des Matériaux

Présentée et soutenue publiquement le 07 juin 2022

Devant un jury composé de :

Vanessa PREVOT	Directeur de Recherche CNRS (ICCF – Université de Clermont-Ferrand)	Rapporteuse
Bernard CATHALA	Directeur de Recherche INRAE (INRAE Nantes Géraudière – Nantes)	Rapporteur
Dominique HOURDET	Professeur Sorbonne Université (SIMM, Paris-PSL)	Examineur
Clémence SICARD	Maitresse de conférences (ILV, Université de Versailles)	Examinatrice
Sylvain DEVILLE	Directeur de Recherche CNRS (ILM- Université Claude Bernard Lyon1)	Examineur
Francisco M. FERNANDES	Maître de conférences (LCMCP-Sorbonne Université, Paris)	Directeur de thèse









# Remerciement

---

Je souhaiterais en premier lieu remercier Francisco Fernandes, qui m'a tout d'abord ouvert les portes du LCMCP pour un passionnant stage de Master 2, et qui m'a ensuite accompagné tout au long de ces 4 années d'aventure enrichissantes, tant scientifiquement qu'humainement. Merci pour ton enthousiasme et pour m'avoir soutenu dans les moments de doute. Merci pour ce florilège d'idées, d'innovations et d'hypothèses toutes inspirantes et stimulantes. Merci encore, de m'avoir donnée cette autonomie, me permettant d'exprimer ma créativité, mais aussi de m'avoir accompagné lors de mes élucubrations. Merci enfin, pour toutes ces compétences que tu m'as transmises et pour ta gentillesse (n'oublions pas les breakfasts meeting !).

Je souhaite exprimer ma gratitude envers les membres du jury : Vanessa Prevot, Bernard Cathala, Dominique Hourdet, Clémence Sicard, Sylvain Deville et Francisco Fernandes. Je vous remercie pour votre intérêt et pour le temps que vous avez accordé à la lecture de mon manuscrit. Je serais ravi d'échanger avec vous lors de la soutenance, cette thèse pourra enfin être aboutie grâce à vos pertinentes remarques et suggestions constructives.

Je tiens aussi à remercier Sylvain Deville qui nous a accueilli chaleureusement à deux reprises afin de réaliser des expériences passionnantes, alliant bactéries, microscopie confocale et croissance contrôlée de cristaux de glace. Merci également à Sandra Casale pour ses clichés TEM et ses cartographies élémentaires au sein du LRS ainsi qu'aux membres de l'IBPS (Jean-François Gilles, Chloé Chaumeton) pour leur expertise de la microscopie confocale et du traitement des données.

Je tiens à remercier les directeurs du LCMCP : tout d'abord Florence Babonneau pour m'avoir accueilli dès mon stage de master dans ce laboratoire qui arrive à faire rimer bonne humeur avec excellence scientifique, puis à Christian Bonhomme et François Ribot pour avoir perpétué cet esprit qui fait la qualité du laboratoire ainsi que pour leur disponibilité et leur soutien.

Un grand merci à Hélène Gervais et à Corinne Pozzo Di-Borgo sans qui la bonne humeur et le laboratoire ne pourraient pas fonctionner. Merci également à Simon Dadoun pour tous les problèmes informatiques (et logistiques) que tu as pu résoudre durant ces années ainsi qu'à Diana Lesueur et Nora Abdoul-Arabi pour leur efficacité.

Je souhaite également remercier Isabelle Génois pour ses clichés de qualités et pour m'avoir transmis une partie de son art sur le MEB, un grand merci à Bernard Haye pour toute son aide

pour les échantillons TEM (mais aussi pour la soute !) et pour sa bonne humeur ! Merci également à Patrick Le Griel et à Gervaise Mosser pour les observations et analyses. Merci à Guillaume Laurent, Christian Bonhomme et Cédric Lorthioir pour leur expertise de la RMN. Merci à Laurence Rozes de m'avoir accueilli en salle méca et de m'avoir accordé sa confiance pour la responsabilité de la DSC. Enfin merci à Christophe Helary pour m'avoir ouvert les portes du labo bactériolo et de m'avoir initié à la microbiologie.

Je tiens également à remercier tous les membres du LCMCP qui font vivre ce laboratoire et avec qui on peut assouvir sa curiosité à travers de riches discussions mais aussi à travers les parties de pétanques et des repas de Noël ! Merci à la team du 5<sup>ème</sup> pour leurs discussions passionnées et leur amitié, merci aux nanos et pour tous les gâteaux et les pauses thés (Vivianne, Cindy, Mariette, Mélissa, Lise, Rhune, Chloé, Caroline, Alexis et une pensée émue à Florian et à Guillaume, petits anges partis trop tôt). Merci à tout le couloir MatBio pour votre bonne humeur. Merci enfin à toute l'équipe MatBio (Thibaud, Gervaise, Bernard, Francisco, Léa, Sylvie et Ahmed), en particulier à Thibaud Coradin et à Gervaise Mosser qui ont savamment orchestré l'équipe et pour leur disponibilité et leur gentillesse. Un grand merci aux doctorants et post-doctorants de l'équipe, Kévin, Antoine, Nicolas, Kun, Stéphanie, Océane, Marie et Katsuya, pour cette expérience inoubliable, pour leur amitié et conseils (et nombreux gâteaux). Je souhaite remercier chaleureusement Camille, pour tous les moments passés ensemble (les découvertes, les débats et pour ton amitié), Isabelle pour ton soutien, nos échanges, podcasts et pour ton pep's ! Un grand merci également à mes stagiaires (officielle et non officielle), Alshaba et Léa pour toutes ces nuits à compter les *P. putida*, pour leur soutien inconditionnel, leur gentillesse et pour m'avoir supporté. Un grand merci au champion de la collo pour tout ce temps passé confiné ensemble, pour les sessions escalades et les sessions moins sportives ! Merci Kankan, tu as été un peu mon deuxième encadrant de thèse, merci pour toutes tes connaissances, pour ta gentillesse débordante et ton soutien.

Je souhaite également remercier mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ces 4 années, toujours présents pour la motivation et pour passer des bons moments ! Merci en particulier à Melissa, Alexis, Marine et Paul pour leur amitié indéfectible et pour avoir cru en moi jusqu'au bout. Je remercie du fond du cœur ma famille, mes grands parents et mes parents pour leur amour et leur présence, aux Eschenhunters pour m'avoir encouragé du début à la fin !

Merci encore à chacun d'entre vous.



# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I :    <b>CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART .....</b></b>	<b>7</b>
I.1 <b>POLLUTION ET DEPOLLUTION .....</b>	<b>9</b>
I.1.a <i>État des eaux européennes.....</i>	<i>9</i>
I.1.b <i>Type de polluants &amp; leur origine.....</i>	<i>10</i>
I.1.c <i>Pollution par Colorants.....</i>	<i>10</i>
I.1.d <i>Méthodes de traitement des effluents contaminés par des colorants textiles.....</i>	<i>11</i>
I.1.e <i>Bioremédiation .....</i>	<i>13</i>
I.1.f <i>Conclusion.....</i>	<i>17</i>
I.2 <b>ENCAPSULATION .....</b>	<b>17</b>
I.2.a <i>L'attachement de surface.....</i>	<i>18</i>
I.2.b <i>L'encapsulation et le piégeage .....</i>	<i>19</i>
I.2.c <i>L'agrégation .....</i>	<i>22</i>
I.2.d <i>Matériaux pour l'encapsulation .....</i>	<i>23</i>
I.3 <b>FREEZE-CASTING .....</b>	<b>27</b>
I.3.a <i>Principe du Freeze-casting.....</i>	<i>27</i>
I.3.b <i>Évolution et applications du freeze-casting.....</i>	<i>29</i>
I.3.c <i>Microorganismes et congélation.....</i>	<i>32</i>
<b>CHAPITRE II :    <b>FREEZE-CASTING ET ENCAPSULATION .....</b></b>	<b>39</b>
II.1 <b>QUELLE SOUCHE BACTERIENNE ET DANS QUEL MATERIAU ?.....</b>	<b>41</b>
II.1.a <i>Pseudomonas putida, une espèce pertinente pour la bioremédiation .....</i>	<i>41</i>
II.1.b <i>L'alginate, biopolymère d'encapsulation par excellence.....</i>	<i>42</i>
II.2 <b>LA CONGELATION DIRECTIONNELLE COMME STRATEGIE DE STRUCTURATION .....</b>	<b>44</b>
II.2.a <i>Contrôle de la vitesse du front de glace.....</i>	<i>44</i>
II.2.b <i>Impact de la vitesse du front de glace sur la morphologie des pores.....</i>	<i>48</i>
II.3 <b>DIAGRAMME DE COMPOSITION .....</b>	<b>54</b>
II.3.a <i>Analyses thermiques.....</i>	<i>54</i>
II.3.b <i>Analyse spatiale de la croissance des cristaux.....</i>	<i>61</i>
II.4 <b>LA CONGELATION DIRECTIONNELLE COMME OUTIL POUR L'ENCAPSULATION DE BACTERIES .....</b>	<b>66</b>
II.4.a <i>Encapsulation .....</i>	<i>67</i>
II.4.b <i>Viabilité.....</i>	<i>74</i>
II.5 <b>CONCLUSION.....</b>	<b>79</b>
<b>CHAPITRE III :    <b>STABILISATION DES MATRICES D'ALGINATE OBTENUES PAR CONGELATION</b></b>	
<b>DIRECTIONNELLE    <b>81</b></b>	
III.1 <b>STABILISATION PAR RETICULATION IONIQUE ET AMELIORATION .....</b>	<b>83</b>

<i>III.1.a</i>	<i>Stabilisation des matrices structurées par freeze-casting : lyophilisation et réticulation....</i>	84
<i>III.1.b</i>	<i>Réticulation topotactique des matrices d'alginate cellularisées.....</i>	87
III.2	CARACTERISATION DES MATRICES HYDROGELS SANS BACTERIES.....	98
III.3	ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA RÉTICULATION TOPOTACTIQUE.....	107
III.4	VIABILITÉ DES BACTÉRIES ENCAPSULÉES DANS DES MATRICES STABILISÉES PAR RÉTICULATION TOPOTACTIQUE.....	112
III.5	CONCLUSION.....	120
<b>CHAPITRE IV :</b>	<b>BIODEGRADATION .....</b>	<b>123</b>
IV.1	BIODEGRADATION .....	125
IV.2	STABILISATION DES HYDROGELS PAR REVÊTEMENT DE CHITOSANE.....	136
IV.3	CONCLUSION.....	146
<b>CHAPITRE V :</b>	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>.....</b>	<b>A</b>
COMMUNICATIONS .....	.....	A
CALCUL BACTÉRIES .....	.....	A
PROTOCOLE DE FONCTIONNALISATION DE L'ALGINATE PAR L'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCÉINE :	.....	B
FIXATION DES ÉCHANTILLONS EN RESINE POUR OBSERVATION TEM .....	.....	B
PROTOCOLE DE FONCTIONNALISATION DU CHITOSAN AVEC LA RHODAMINE ISOTHIOCYANATE :	.....	C
<b>CHAPITRE VI :</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>I</b>



# **Introduction Générale**





L'impact de l'Homme sur l'environnement et les écosystèmes constitue une problématique de premier plan de ce 21<sup>ème</sup> siècle. La pollution de l'air, des sols et des eaux endommage des écosystèmes déjà fortement affaiblis par les différents fléaux de l'activité humaine (réchauffement climatique, surexploitation, destruction des habitats naturels menant à la sixième extinction de masse, etc...). La pollution des eaux est particulièrement problématique à cause de la large diffusion possible des polluants et à l'importance de l'eau pour toute forme de vie. Cette pollution impacte ainsi la santé des êtres humains directement et indirectement à travers les réseaux trophiques.

Ces polluants peuvent être naturellement dégradés – dégradation physique, chimique ou biologique (à travers la bioremédiation) – cependant la persistance de certains de ces contaminants nécessite une intervention humaine en vue de la restauration des écosystèmes. La bioaugmentation est une stratégie prometteuse consistant en l'introduction d'organismes exogènes (provenant d'un autre milieu) choisis pour leur capacité à dégrader spécifiquement les polluants persistants. Ces organismes exogènes peuvent être des plantes, des algues, des champignons ou encore des bactéries. Cette introduction d'organismes exogènes soulève une double question : celle d'un possible déséquilibre de l'écosystème, déjà perturbé, mais aussi de la sensibilité des organismes introduits aux conditions du milieu qui peuvent affecter leur viabilité et efficacité de dépollution.

Dans ce contexte, l'utilisation de cellules encapsulées – plutôt qu'en suspension – a été rapportée dans la littérature<sup>1</sup>. Cette approche d'emprisonnement des microorganismes dans des matrices adaptées permet de limiter leur diffusion et leurs impacts potentiellement néfastes sur l'écosystème, tout en leur conférant une protection contre les conditions physico-chimiques du milieu. L'efficacité de la dépollution d'une telle approche réside dans la capacité des microorganismes à dépolluer les molécules ciblées mais aussi dans le choix de la matrice d'encapsulation. Les matériaux utilisés ainsi que la structure de la matrice jouent un rôle crucial pour permettre une dépollution par les microorganismes.

L'utilisation de biopolymères comme matrice d'encapsulation a été largement étudiée dans la littérature<sup>2,3</sup> en raison de leur cyto-comptabilité. La structure, quant à elle, est préférée macroporeuse en vue de la diffusion des polluants à travers le substrat. Dans cette thèse nous présenterons les résultats et réflexions sur l'encapsulation de bactéries dans des matrices d'alginate par la technique de congélation directionnelle, pour la biodégradation de colorants azoïques. La congélation directionnelle est une technique facile à mettre en œuvre, peu chère et applicable à une large gamme de biopolymères. Elle repose sur le contrôle de la croissance

de cristaux de glace dont le négatif permet l'obtention de pores fortement anisotropes ainsi que l'encapsulation de cellules au sein des parois des matrices<sup>4</sup>. Nous avons alors étudié le contrôle de la structure macroporeuse et de la viabilité à travers différents leviers tels que la vitesse de croissance des cristaux (appelée vitesse du front de glace) et la concentration des microorganismes. La compréhension de l'évolution du microenvironnement autour des bactéries lors de leur congélation nous a aussi particulièrement intéressé.

Malgré le fort potentiel de cette technique pour former des matrices cellularisées, anisotropes et macroporeuses, les nombreuses étapes de stabilisation nécessaires pour une utilisation en milieu aqueux diminuent drastiquement la viabilité des bactéries encapsulées. Afin de maximiser la viabilité de *P. putida* dans ces matrices d'alginate – ce qui permettrait une biodégradation plus efficace – nous avons conçu une nouvelle approche de traitement basée sur la dépression cryoscopique de la glace induite par des agents de réticulation ioniques. Cette approche que nous avons qualifié de réticulation topotactique, permet la stabilisation des matrices en une seule étape, éliminant le besoin d'une étape de séchage délétère

Les matériaux macroporeux résultants hébergent des bactéries métaboliquement actives. De plus les canaux alignés favorisent un transport efficace des liquides, suggérant des performances intéressantes dans la biodégradation. Dans ce manuscrit, nous aborderons les implications de chaque étape (la congélation, le séchage et la réticulation topotactique) sur l'évolution du microenvironnement des bactéries ainsi que leur impact sur leur viabilité. Enfin, à travers l'encapsulation des bactéries *Pseudomonas putida* dans ces matrices, nous montrerons que la technique de la congélation directionnelle couplée à la stabilisation par réticulation topotactique amène à un système complexe fonctionnel pour la biodégradation de polluants.





# **Chapitre I : Contexte et État de l'art**



## I.1 Pollution et dépollution

### I.1.a État des eaux européennes

L'eau est une ressource primordiale pour toute forme de vie sur terre, elle joue un rôle clef dans l'équilibre des écosystèmes. L'espèce humaine ne fait pas exception, en plus d'être vitale, l'eau est aussi un moteur pour le développement des sociétés. De plus, 96.5% de l'eau sur terre est contenue dans les océans sous forme salée. Les 3.5% restants sont de l'eau douce que l'on peut retrouver dans les lacs, les rivières, les nappes phréatiques et dans les glaciers<sup>5</sup>. L'eau douce est donc une ressource rare et précieuse dont il faut prendre soin.

D'après les études de 2015 de l'*European Environment Agency* (EEA)<sup>6-8</sup>, 75% des eaux souterraines d'Europe seraient en situation de « good chemical status » contre seulement 44% pour les eaux de surface. Entre 75 et 96% des mers européennes ont des problèmes de pollution d'origine humaine principalement dues aux produits chimiques et aux métaux lourds. D'autres problématiques viennent s'ajouter à la pollution de l'eau, telles que sa surexploitation au détriment des besoins naturels de l'écosystème, la détérioration du cycle de l'eau par les barrages et son réchauffement par les centrales thermiques (déstabilisant de même les flux migratoires dans les rivières)<sup>9</sup>. La pollution des eaux par les plastiques est un problème d'importance car elle a un impact néfaste fort sur la biodiversité. De plus, ces plastiques ont la capacité d'absorber les polluants (notamment les hydrocarbures) et les concentrent localement, augmentant encore leurs effets délétères sur les organismes aquatiques<sup>6</sup>.

La notion de pollution peut être définie comme étant un déséquilibre ou une altération du milieu dû à la présence de composés spécifiques, rendant alors l'environnement nocif pour l'écosystème et par extension pour l'humain<sup>7,8</sup>.

Restaurer un milieu pollué demande l'extraction ou la dégradation des polluants ainsi que le retour à l'équilibre, si possible initial, de l'écosystème. Le premier pas vers cette restauration est alors d'identifier les sources et les types des polluants présents dans le milieu.



### I.1.b Type de polluants & leur origine

Comme nous venons de le voir, les eaux souterraines européennes montrent un bien meilleur état que les eaux de surface ou que les mers. Nous allons donc nous concentrer brièvement sur les types et l'origine des polluants que l'on retrouve dans les rivières, lacs et mers d'Europe.

Les deux sources des stress principales exercées sur ces eaux sont les conditions climatiques et leur surexploitation<sup>9</sup>. Ces stress entraînent une détérioration de l'eau en quantité (sécheresse, demande et besoins croissants) et en qualité (pollution et eutrophisation). Lorsque l'on regarde le facteur humain, en moyenne, 240 000 hectomètres cubes d'eau douce sont utilisés chaque année en Europe dont la majorité retourne dans l'environnement contenant des impuretés ou des produits chimiques toxiques (140 000 hectomètres cubes)<sup>9</sup>. Les plans d'eau peuvent être altérés par la pollution rejetée directement par des activités ponctuelles telles que les industries ou les stations d'épuration, mais ils sont aussi fortement impactés par la pollution rejetée dans l'air ou dans le sol et qui se retrouve finalement dans l'eau par diffusion – nous pouvons évoquer ici l'agriculture ou les transports, et plus globalement la pollution de l'air<sup>10</sup>.

### I.1.c Pollution par Colorants

L'industrie textile est un des domaines les plus polluants à ce jour. Elle utilise en effet une importante quantité d'eau qu'elle rejette ensuite dans les rivières, contaminée par des impuretés telles que des détergents, des métaux lourds, des colorants ou des suspensions insolubles<sup>11-15</sup>. Cette industrie utilise une variété de plus de 10 000 colorants différents et rejette dans ses eaux usées environ 15% de tous ses colorants utilisés, soit environ 100 tonnes/an<sup>16-21</sup> dans le monde.

La présence de colorants dans ces eaux, même en faible concentration, peut avoir de graves conséquences sur la faune et la flore mais aussi sur la santé humaine<sup>18,22</sup>. En effet, ils changent la couleur des eaux, diminuent la quantité de lumière disponible impactant fortement le processus de photosynthèse de la flore<sup>23</sup> et pouvant causer une eutrophisation des eaux – une accumulation de nutriments qui provoque un déséquilibre de la biodiversité. Ces colorants diminuent de plus la disponibilité de l'oxygène dans l'eau, de plus, leur persistance dans le milieu ainsi que leur bioaccumulation dans les organismes, accentuent leur effet délétères et toxique<sup>24,25</sup>. Il est important de noter qu'une réévaluation de leur toxicité, tend à montrer que leur effets cancérigènes, mutagènes ainsi que leur toxicité ont été sous-estimés dans les décades précédentes<sup>26</sup>. Ces colorants impactent aussi fortement la santé humaine lorsqu'ils remontent la chaîne alimentaire<sup>27</sup>.

Il existent différentes stratégies pour classifier les colorants textiles<sup>16,19,28</sup> : par origine, par couleur, par structure (ou groupements fonctionnels), par méthode d'application ou bien par leur charge (cationiques = basiques ; anioniques = acides, directes et réactives ; neutres = disperses)<sup>20</sup>. La grande majorité des colorants utilisés contient un ou plusieurs cycles aromatiques et fait partie du groupe de colorants azoïques (>70%)<sup>29,30</sup>. Comme la majorité des composés organiques, ces colorants peuvent être naturellement dégradés par des mécanismes tels que l'oxydation, la photo-dégradation ou bien de la biodégradation.

#### I.1.d Méthodes de traitement des effluents contaminés par des colorants textiles

Lorsqu'un polluant atteint un milieu donné, plusieurs possibilités s'ouvrent alors. Il peut garder une certaine mobilité et être transféré vers un autre milieu, par lixiviation (en passant par l'hydrosphère) ou par volatilisation (en passant par l'atmosphère) contaminant alors cet autre milieu. Il peut sinon s'accumuler dans le premier milieu atteint en détériorant l'écosystème correspondant. Enfin, il peut subir des dégradation biotiques ou abiotiques. En effet, les milieux naturels peuvent dégrader certains contaminants par le biais de processus physico-chimiques ou biologiques. Cependant certains polluants ne sont pas dégradables (même si certains processus de réduction, d'oxydation ou de complexation peuvent réduire leur toxicité). Parmi ces polluants se trouvent les métaux – qui peuvent être extrêmement toxiques pour les êtres vivant, notamment pour l'homme s'ils parviennent à remonter la chaîne alimentaire – ou bien les matériaux radioactifs<sup>31</sup>.

Dans la majeure partie des polluants persistant dans les eaux, l'action de l'homme est nécessaire pour restaurer l'environnement. Pour cela il existe différentes stratégies : la dégradation physico-chimique et la biodégradation.

De multiples traitements physico-chimiques ont été mis au point pour le traitement des eaux usées : l'adsorption, la floculation et coagulation, la photo-dégradation, les oxydations ou encore les membranes.

Ces stratégies de décontamination doivent être soigneusement choisies afin de garantir leur adaptation aux polluants et aux sites contaminés. L'*United States Environment Protection Agency*<sup>32</sup> met en avant une variété de techniques pour le traitement des sols et des eaux pollués. Cependant, afin d'avoir un rétablissement complet du milieu il peut être nécessaire de combiner plusieurs techniques. En effet, comme nous allons le voir, la plupart des traitements physico-

chimiques ont des inconvénients non négligeables tels que leur coût, la génération de produits de dégradation toxiques ou encore de grandes quantités de boues d'épuration.

De nombreux procédés sont utilisés pour le traitement des eaux usées notamment à travers des stratégies d'adsorption. Ainsi, une large gamme de matériaux a été synthétisée (charbon actif, copeaux, gels de silices, zéolites et autres matrices) avec de grandes surfaces spécifiques et de bonnes capacités d'adsorption, applicables à différents polluants<sup>33,34</sup>. Facilement applicable, peu chère, efficace et partiellement régénérable, ces techniques sont couramment utilisées pour nettoyer des milieux pollués<sup>35-37</sup>. Cependant, ces techniques de captation ne permettant pas la dégradation des polluants, elles doivent être couplées à d'autres stratégies pour obtenir une dépollution complète. Bien que les stratégies de floculation et de coagulation des polluants sont efficaces et massivement utilisées, la grande quantité de boues d'épuration générée et le coût des procédés élevé<sup>20,38</sup> appellent à l'innovation dans ce domaine de la dépollution.

La décoloration des eaux usées par oxydation est la stratégie physico-chimique la plus couramment utilisée<sup>33</sup>. Sa popularité vient de la facilité de mise en œuvre du procédé. Le mécanisme de cette stratégie est l'oxydation et le clivage entre les cycles aromatiques des polluants<sup>39</sup>. Une grande variété d'agents oxydants a été identifiée et utilisée conventionnellement : le peroxyde d'hydrogène (activé par le rayonnement ultraviolet), hypochlorite de sodium ou encore par déstructuration électrochimique<sup>20</sup> ou photo-oxydation. Bien que la dégradation soit effective, les sous-produits sont souvent toxiques et créent aussi une boue d'épuration qui reste à traiter. De plus ces procédés sont chers et consommateurs d'énergie. Le cas particulier de l'ozonation est prometteur car il ne génère aucune boue supplémentaire à traiter, son coût reste cependant considérable<sup>39</sup>.

L'utilisation de membranes comme technique de filtration des eaux usées est une méthode très prometteuse. Certaines techniques telles que l'osmose inverse, la nanofiltration et l'ultrafiltration sont déjà utilisées pour dépolluer les eaux usées de certaines industries textiles<sup>40-42</sup>. Leur facilité d'installation et d'utilisation ainsi que de maintenance en fait des candidats intéressants. De plus, des avancées récentes permettent d'augmenter la sélectivité des membranes<sup>20,43</sup>. Cependant, l'obstruction et l'encrassement des membranes ainsi que la gestion des résidus de polluants concentrés dessus sont un frein à leur utilisation. Enfin, les polluants ne sont pas minéralisés ou valorisés, il faut donc ajouter une étape de traitement supplémentaire. L'incapacité des membranes à traiter de grands volumes d'eaux usées ainsi que leur instabilité sous de fortes pressions sont encore des points d'amélioration<sup>33</sup>.

Alternativement à ces stratégies physico-chimiques, la bioremédiation est vue aujourd'hui comme une stratégie écologiquement responsable (peu polluante et peu chère en énergie) et efficace<sup>44</sup>. Elle se base sur l'utilisation d'organismes vivants pour effectuer une captation et minéralisation complète des polluants<sup>18,45,46</sup>.

## I.1.e Bioremédiation

### *I.1.e.i Principe de la bioremédiation*

La bioremédiation se définit comme l'utilisation d'entités biologiques pour décontaminer un milieu et englobe une variété de techniques allant de la biodégradation à la biosorption en passant par la phyto-remédiation.

La biodégradation peut se définir comme l'utilisation d'organismes vivants pour la dégradation de composés polluants. Cette définition englobe toutes les variétés d'utilisation de plantes, de bactéries, de levures et d'algues pour la remédiation de différents types de polluants tels que des HAP, des colorants, des métaux, entre autres. La biodégradation est considérée comme étant plus écologiquement responsable – peu polluante et peu cher, tant financièrement qu'énergétiquement – et potentiellement plus efficace que les techniques physico-chimiques. La biodégradation peut mener, dans des cas spécifiques, jusqu'à la minéralisation complète des polluants organiques en produits non toxiques<sup>18,44,47</sup> (tels que CO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O).

Il faut cependant bien distinguer la biodégradation de la biosorption. Cette dernière est en effet un mécanisme qui agit naturellement dans l'environnement en présence d'organismes et qui diminue la pollution de son écosystème en l'adsorbant. Cependant la biosorption laisse intacte la structure chimique des contaminants, elle ne les dégrade pas en fragments et, par conséquent, ne règle pas le problème de la pollution<sup>48</sup>. En effet, bien que des produits néfastes soient adsorbés par la biomasse, ils restent toxiques – le plus souvent pour l'organisme lui-même – et peuvent être soit relargués à la mort de cet organisme soit remonter dans une chaîne alimentaire. De plus, leur rétention par des organismes non capables de biodégradation peut être un frein aux processus de dépollution<sup>49</sup>. La biosorption peut néanmoins être un levier non négligeable pour la dépollution en permettant aux organismes capables d'effectuer de la biodégradation de capter une plus grande quantité de contaminants, augmentant ainsi leur efficacité.

Le principe de biodégradation est applicable à un large spectre d'écosystèmes – à différents types de sol (sablonneux, argileux, limoneux) et d'eau (lacs, rivières, eaux souterraines,

environnements marins, eux usées d'origine humaines) – ainsi qu'à un large éventail de polluants. De nombreux travaux font état de biodégradation appliqués avec succès aux métaux<sup>50,51</sup>, aux huiles minérales<sup>52</sup>, aux pesticides<sup>53</sup>, aux colorants<sup>54,55</sup> ou encore aux hydrocarbures<sup>56</sup>.

#### *1.1.e.ii La phytoremédiation*

Certaines définitions de la bioremédiation séparent la phytoremédiation – l'utilisation de plantes pour décontaminer – et la biodégradation – comme l'utilisation uniquement de microorganismes<sup>57</sup>. La phytoremédiation consiste en l'utilisation de plantes et de leur biotopes associés (le plus souvent microbien) pour la décontamination d'un milieu<sup>51,58</sup>. Dans le cadre de la phytoremédiation, les polluants peuvent être dégradés dans la zone racinaire des plantes – procédés de phytostimulation et de rhizodégradation – ou absorbés et transportés vers les feuilles pour d'autres mécanismes de dégradation (souvent photocatalysés). Ils peuvent être aussi séquestrés dans des tissus récoltables (phytoextraction) ou bien se volatiliser<sup>10</sup>. La phytoextraction est principalement utilisée pour cibler des métaux, alors que les mécanismes actifs dans la rhizosphère (zone qui comprend l'espace d'environ 1mm autour des racines) visent naturellement les polluants organiques tels que les colorants, les HAPs et huiles<sup>59,60</sup>.

La rhizosphère nous intéresse tout particulièrement car c'est le siège de deux voies de dégradation complémentaires. Lorsqu'un polluant atteint le système racinaire il peut être soit dégradé par des enzymes sécrétés par la plante elle-même, soit par les communautés microbiennes symbiotiques : la plante relargue des composés issus de la photosynthèse qui peuvent être utilisés comme source de carbone par les bactéries et champignons, augmentant ainsi leur concentration de 1 à 4 ordres de grandeur<sup>61</sup>. De plus d'autres composés relargués par les racines peuvent induire spécifiquement l'expression de gènes microbiens impliqués dans la dégradation ou bien agir comme co-métabolites<sup>62,63</sup>. Cependant la mise en place de dépollution par phytoremédiation est contraignante et demande un espace suffisant proche du site de contamination lui-même et la mise en place de tels systèmes prennent du temps. C'est pourquoi de nombreuses études se focalisent sur l'utilisation uniquement des microorganismes pour dépolluer.

#### *1.1.e.iii Utilisation de microorganismes*

Le terme générique de microorganismes est utilisé tant dans la phytoremédiation que dans la biodégradation, et se rapporte à un large éventail d'acteurs biologiques. Les trois principales familles de microorganismes utilisées<sup>16,47,64</sup> sont les bactéries<sup>55</sup>, champignons<sup>65</sup> (dont les

levures<sup>66</sup>) et les microalgues<sup>67</sup>. Les bactéries sont la famille la plus utilisées pour la bioremédiation pour leur exceptionnelle variété et adaptabilité<sup>31,68,69</sup>. De plus, des études mettent en avant l'utilisation de consortia de microorganismes tels que différentes souches de bactéries, des bactéries et des microalgues<sup>70</sup> ou des bactéries et champignons<sup>71</sup> pour atteindre un effet synergique de dégradation<sup>72</sup>.

Bien que de nombreuses études ont été menées, et indépendamment des microorganismes utilisés, les mécanismes de la biodégradation ne sont pas entièrement compris à cause de leur complexité et de celle des milieux. Cependant, certains mécanismes généraux de biodégradation ont été identifiés. Il y a en effet deux principales voies de dégradation qui opèrent lors de la biodégradation : une ayant lieu dans l'espace intracellulaire des microorganismes et une autre ayant lieu dans l'espace extracellulaire. Dans le cas d'une dépollution externe, les mécanismes de dégradation sont basés sur l'utilisation d'exo-enzymes qui officient dans leur microenvironnement. Bien que ces phénomènes soient très variés et complexes à étudier, certaines étapes classiques restent communes à la dégradation par la voie interne. En effet, la première étape de ces décontaminations est la captation des polluants ciblés, plusieurs mécanismes sont identifiés tels que l'utilisation de chélateurs ou de surfactants<sup>73</sup>. Dans le cas d'une biodégradation par voie interne, une étape supplémentaire d'internalisation est nécessaire. Les polluants peuvent ensuite soit être utilisés comme ressources et métabolisés (source de carbone) ou bien traités par un mécanisme de défense et dégradés.

Il existe trois principales stratégies pour la mise en place d'une décontamination *in situ* par biodégradation qui sont la bioatténuation, la biostimulation et la bioaugmentation. La bioatténuation concerne la capacité de dépollution naturelle du milieu contaminé. Des milieux naturels ont la capacité à s'auto-nettoyer grâce aux différents organismes présents. L'adaptabilité des microorganismes endogènes permet en effet de sélectionner naturellement les souches capables de survivre dans de telles conditions, tout en dépolluant progressivement leur environnement. Cette stratégie consiste alors en la surveillance de la concentration des polluants pour rester dans un domaine de concentration de polluants acceptable permettant cette sélection.

La biostimulation est appliquée lorsque la bioatténuation n'est pas assez rapide ou suffisamment efficace en raison des concentrations de polluants trop importantes pour le maintien de la population microbienne endogène. Cette stratégie consiste donc en l'ajout d'additifs – des nutriments, des systèmes donneurs ou accepteurs d'électrons, des sources de carbone<sup>44,74</sup> – qui aident les mécanismes de dégradation des microorganismes endogènes. Par

exemple, l'augmentation de la disponibilité des polluants par l'ajout de chélateurs et de surfactants, ou encore la gestion de l'oxygénation du milieu sont des stratégies répertoriées en biostimulation<sup>73</sup>.

Dans les cas où la pollution surpasse les capacités d'action des organismes endogènes – par exemple trop grande concentration de polluants, présence de contaminants non dégradables par les organismes présents, ou simplement trop faible quantité d'organismes endogènes – les deux précédentes stratégies ne sont plus suffisantes. La bioaugmentation peut alors être une réponse adaptée pour ces cas extrêmes en introduisant des microorganismes exogènes – qui proviennent d'un autre milieu – qui pourront dégrader ces polluants. Ces microorganismes exogènes sont choisis pour leur capacité à dégrader spécifiquement les polluants ciblés et proviennent donc d'un milieu pollué par le même polluant ou sont sélectionnées et modifiées génétiquement pour accroître leurs capacités de biodégradation. Cette stratégie est également intéressante pour introduire des consortiums de microorganismes. Cependant l'introduction d'organismes exogènes peut se révéler dangereuse en induisant une déstabilisation de l'écosystème déjà fragilisé.

De nombreux paramètres complexifient l'étude de la biodégradation par leurs effets importants sur l'activité des microorganismes<sup>29</sup>. Par exemple, la plupart des souches bactériennes sont plus adaptées aux pH neutres ou légèrement basiques<sup>75,76</sup> alors que des milieux légèrement acides conviennent d'avantage aux champignons et levures<sup>77</sup>. La température influence aussi fortement la capacité de biodégradation des microorganismes, et une température proche de celle du milieu de culture – dépendamment des souches utilisées – permet d'atteindre une dépollution optimale<sup>47,75</sup>. La concentration en polluants et la composition du milieu sont aussi des facteurs importants. En effet, des concentrations trop élevées en polluants peut réduire l'efficacité des microorganismes (des concentrations optimales pour des dégradations optimales sont observées), et la présence de composés donneur ou accepteur d'électrons, la salinité ainsi que la présence de nutriments ont aussi un impact. De plus la présence d'oxygène joue un rôle important car il influence fortement certains mécanismes métaboliques ayant lieu de manière exclusive en milieu aérobique ou anaérobique.

Afin de s'affranchir de la complexité du milieu pouvant rendre la biodégradation difficile, il est possible d'appliquer une stratégie *ex situ*<sup>78,79</sup>. Cette stratégie consiste en la collecte des polluants et leur biodégradation en dehors du site contaminé. Elle permet alors de s'affranchir des limites physiologiques imposées par le milieu en ayant un contrôle fin des paramètres appliqués afin d'optimiser le traitement.

### I.1.f Conclusion

L'utilisation d'organismes pour la dépollution est considérée comme étant compétitive et peu chère, vis-à-vis de leurs homologues physico-chimiques, grâce à leur profil écoresponsable et leur efficacité (pouvant aller jusqu'à la minéralisation complète des polluants sans sous-produits toxiques). Il existe alors différentes stratégies pour trouver le traitement adéquat au milieu, tel que la bioatténuation, la biostimulation, la bioaugmentation, la phytoremédiation et l'utilisation de consortia de microorganismes ou encore des traitement *ex situ*.

Cependant ces techniques ont certains désavantages comme mentionné précédemment. En effet, bien que compétitifs avec les techniques physico-chimiques, la bioremédiation est plutôt lente à mettre en place et à traiter les polluants et ne peut pas être utilisé comme traitement d'urgence. De plus, les écosystèmes pollués étant fragilisés, l'introduction de microorganismes exogènes se doit d'être contrôlée pour éviter tout déséquilibres supplémentaires qui serait fatale à l'écosystème donné. Ces microorganismes sont aussi sensibles aux paramètres physico-chimiques du milieu, tel que la température, le pH, la salinité, qui peuvent être limitant pour l'activité microbienne et la dépollution.

Une dernière stratégie serait en mesure de répondre à ces limitations en protégeant les organismes de ces paramètres contraignants tout en contrôlant leur évolution et en étant déployable rapidement et efficacement. L'encapsulation des microorganismes dans des matrices capables d'assurer leur viabilité est en effet un moyen de combiner les avantages des traitements *in situ* et *ex situ* en augmentant potentiellement leur efficacité de dépollution et leur ténacité dans l'environnement contaminé<sup>1,80,81</sup>.

## I.2 Encapsulation

Les premières techniques d'immobilisation ont été développées initialement pour répondre à des problématiques industrielles, avec pour but de diminuer la consommation de solvants et de développer des procédés industriels plus économes et responsables. C'est dans les années 1960 que la première utilisation industrielle d'enzymes immobilisés a eu lieu<sup>82</sup>. Au Japon, la société Tanabe Company a utilisé une aminoacylase immobilisée de manière covalente sur un support de cellulose pour l'obtention de L-méthionine<sup>77</sup>. Le Japon fut aussi pionnier dans l'immobilisation de cellules – vivantes et mortes, par exemple pour la production d'éthanol et d'acrylamide. Cependant les premiers systèmes à grande échelle d'immobilisation de cellules



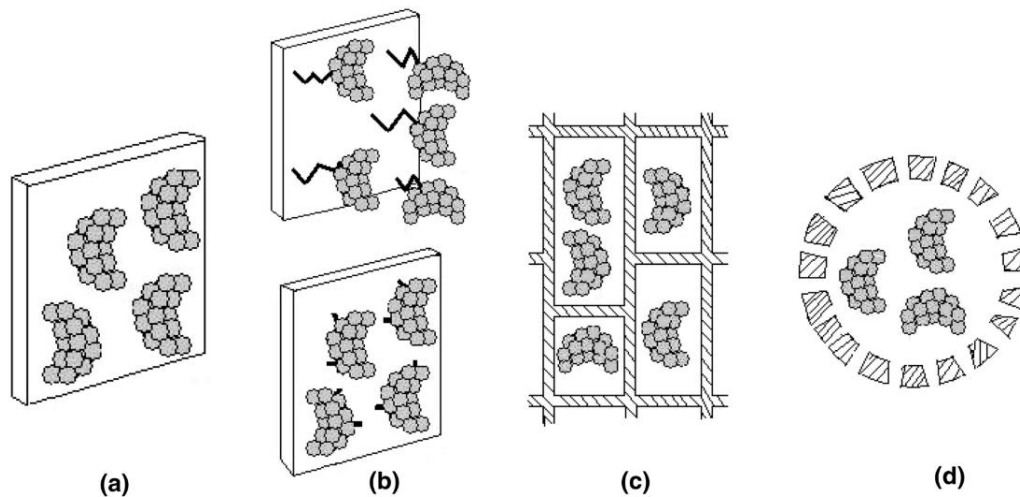
ont vu le jour dans les années 80, avec par exemple l'usine de Bayer aux États Unis où les cellules sont retenues par une membrane dans un système de flux continu<sup>82</sup>.

Il existe en effet, différentes techniques d'immobilisation de cellules que l'on peut séparer en trois stratégies distinctes<sup>1,84,85</sup> : *a)* l'attachement de surface, *b)* l'encapsulation et *c)* l'agrégation.

### I.2.a L'attachement de surface

Cette stratégie d'immobilisation peut être considérée comme la plus anciennement utilisée grâce à sa facilité d'application et sa réversibilité<sup>86</sup>. Elle se traduit par la formation de différentes liaisons entre les microorganismes et le support : liaisons de van der Waals, des liaisons hydrogènes, des interactions d'hydrophobicité, de liaisons ioniques ou encore des liaisons covalentes<sup>87,88</sup>.

Lorsque les liaisons entre le substrat et les microorganismes sont non-covalentes, les forces mises en jeu sont suffisamment faibles pour conserver la structure naturelle des cellules immobilisées et ainsi minimiser l'impact sur leur activité<sup>88,89</sup>. Les principaux avantages de l'immobilisation de surface sont sa rapidité et sa simplicité de réalisation, son efficacité ainsi que son faible coût et, enfin, la possibilité de récupérer le substrat pour y refixer de nouvelles cellules après utilisation<sup>87</sup>. Cependant, certains facteurs intrinsèques et extrinsèques influencent fortement l'efficacité de la liaison telle la nature du support et de l'organisme ou bien du microenvironnement – par exemple le pH, la température ou encore la puissance du flux dans le cas des systèmes sous flux<sup>90,91</sup>. Ainsi la faible force de liaison a le désavantage de présenter un fort taux de relargage des cellules immobilisées durant l'utilisation<sup>87</sup>. Cette technique est principalement utilisée dans le domaine biomédicale pour l'implantation de matrices cellularisées pour la régénération tissulaire<sup>92</sup>.



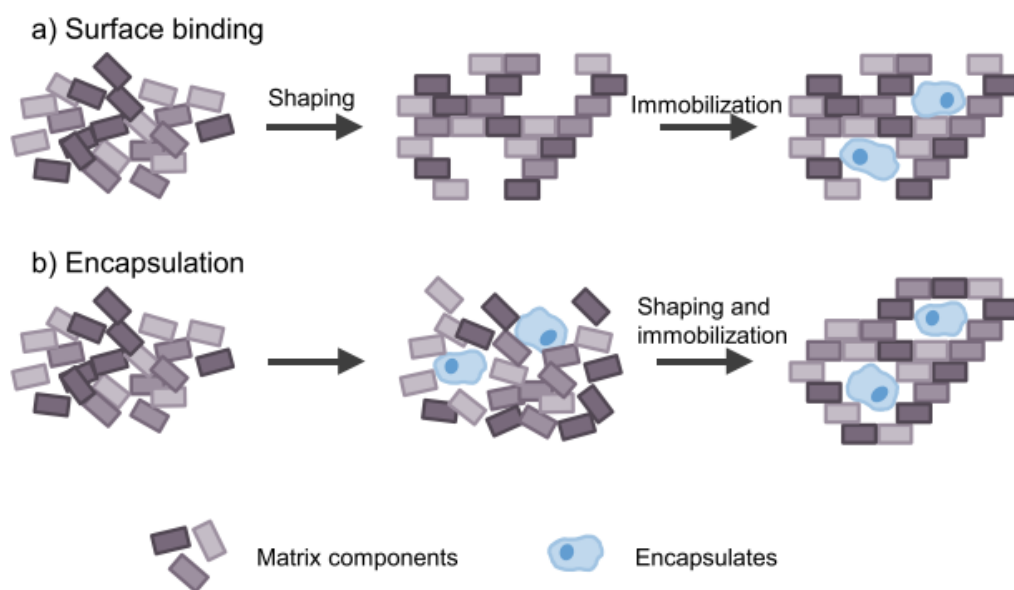
**Figure I-1** : Différentes méthodes d'immobilisation de cellules à un support sont ici proposées : (a) par l'adsorption à la surface du support (interaction physiques faibles) ; (b) par la formation de liaisons covalentes avec cette même surface (liaison chimique forte) ; (c) par piégeage dans une matrice isolante ; et (d) par l'encapsulation dans une matrice perméable. D'après Bouadibi<sup>93</sup>.

Au contraire, lorsque des liaisons covalentes sont établies, les cellules sont attachées fortement aux groupements fonctionnels du support<sup>89</sup>. Ces liaisons sont irréversibles et le taux de relargage négligeable<sup>94</sup>. Cependant les agents de réticulation (le plus communément utilisé est le glutaraldéhyde<sup>95,96</sup>) sont cytotoxiques et impactent fortement la viabilité des cellules immobilisées, diminuant ainsi l'efficacité de la technique<sup>97</sup>. Cette technique est alors principalement utilisée dans l'immobilisation d'enzymes plutôt que de cellules<sup>84,87</sup>.

### I.2.b L'encapsulation et le piégeage

L'encapsulation et le piégeage regroupent un large panel de processus qui permettent d'emprisonner ou d'enrober un ou plusieurs matériaux, particules ou cellules. Dans le cadre de l'immobilisation de microorganismes, cette encapsulation a pour but de protéger les cellules des facteurs extérieurs délétères en réduisant leur exposition aux conditions du milieu – tels que les propriétés physico-chimique de pH, de salinité, de température ou encore la trop grande concentration des polluants<sup>1,80,98</sup>. On peut ainsi définir l'encapsulation de microorganismes comme l'aménagement de leur microenvironnement par la formation d'une matrice qui les englobe – organique, inorganique, voire hybride – adaptée à leurs conditions physiologiques. Il faut donc considérer ces dispositifs comme étant la combinaison d'une partie biologique – choisie spécifiquement pour dégrader un ou plusieurs polluants cibles (la partie fonctionnelle de la biodégradation) – avec une partie structurelle – conçue pour protéger la partie biologique en leur conférant un milieu adapté.

Il est crucial de bien choisir les matériaux d'encapsulation ainsi que la structure de la matrice. Ce sont en effet les interactions entre les microorganismes encapsulés et les matériaux de la matrice qui vont en partie définir la qualité de la protection. Afin de mieux adapter le système à son application finale, des morphologies et des techniques très variées ont été proposées, telles que l'encapsulation dans des coquilles<sup>99</sup>, des films<sup>100</sup>, des fibres<sup>101</sup>, des gels<sup>102</sup> entre autres. Ces morphologies sont primordiales car elles définissent, en partie, comment les cellules interagissent avec le milieu dans lequel elles sont introduites (vis-à-vis de la diffusion, de l'accessibilité), mais elles définissent aussi comment les cellules vont pouvoir se développer (contrôle de la prolifération des levures ou bactéries encapsulées par exemple).

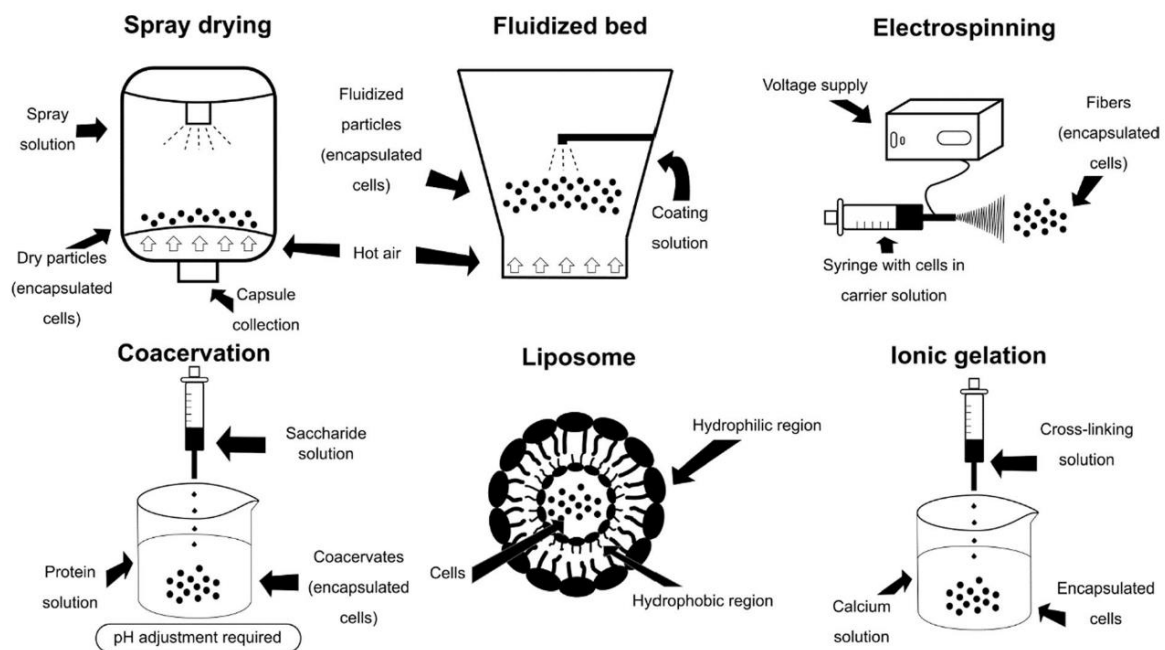


**Figure I-2:** L'immobilisation des cellules par liaison de surface est réalisée en deux étapes avec tout d'abord la formation d'un support matriciel puis de la liaison des cellules. À l'inverse, les stratégies d'encapsulation se caractérisent par la formation de la matrice directement autour des cellules à immobiliser. D'après Christoph<sup>103</sup>.

Le piégeage consiste en l'immobilisation irréversible de microorganismes à l'intérieur d'une matrice de support lors de l'étape de formation de cette matrice<sup>87</sup>. Il est important de préciser ici que le piégeage et l'encapsulation se font lors de l'étape de structuration de la matrice, les microorganismes sont alors présents à cette étape et se retrouvent à l'intérieur de la matrice de support, piégés physiquement – contrairement aux techniques d'immobilisation de surface qui structurent d'abord une matrice de support puis y ajoute les microorganismes (Figure I-2). Cette immobilisation au sein d'une matrice offre alors une forte protection contre les agressions extérieures,<sup>104</sup> tout en conservant l'activité métabolique des microorganismes et empêche leur relargage<sup>3,93</sup>. L'encapsulation dans une matrice semi-perméable permet un bon développement

des microorganismes mais induit également une stabilité et une résistance mécanique moindres<sup>3,93</sup> ce qui peut donner lieu à un relargage progressif des cellules encapsulées.

Dans le domaine de la bioremédiation, l'encapsulation de biocatalyseurs tel des enzymes<sup>105</sup>, des microalgues<sup>106</sup>, des champignons<sup>107</sup> et des bactéries<sup>1,108,109</sup> joue un rôle central. En effet, l'encapsulation apporte un avantage sur la viabilité et permet d'utiliser ces biocatalyseurs complexes et sensibles pour des applications de bioremédiation lorsque le système matrice-organisme-milieu est bien choisi.



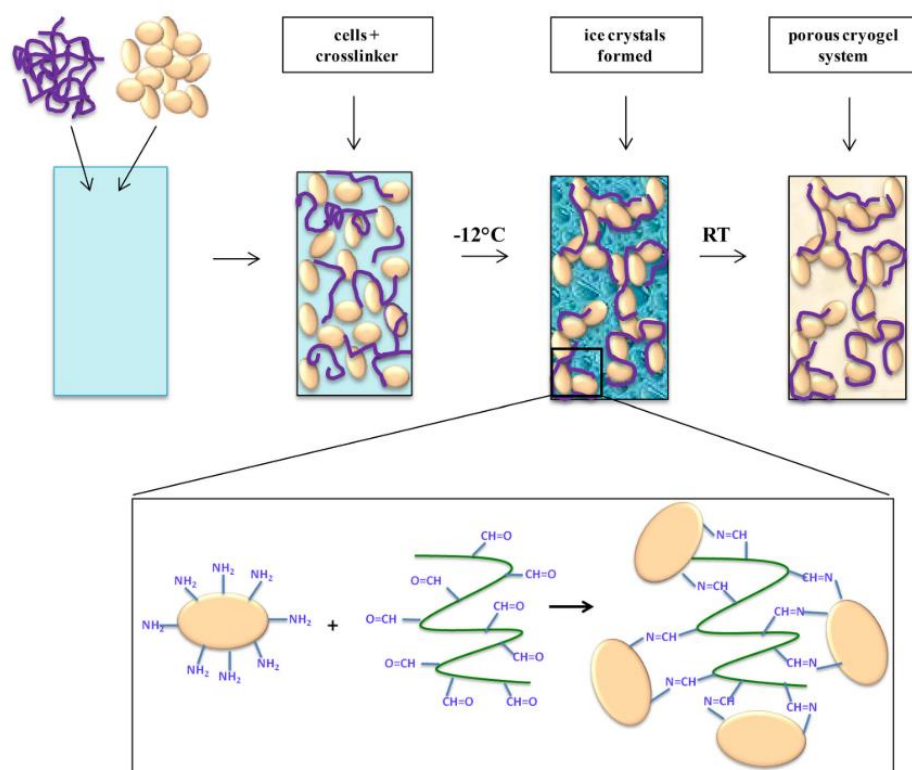
**Figure I-3:** Exemples de techniques d'encapsulation : Séchage par atomisation, billes fluidifiées, électro-filage, liposome, coacervation et gélification ionique. D'après Valdivia-Rivera<sup>3</sup>.

Pour résumer, l'encapsulation est une technique d'immobilisation permettant la protection des microorganismes contre les facteurs externes, caractéristiques du milieu, prodiguant ainsi une amélioration de la viabilité et de l'activité catalytique. De plus, l'avantage de cette technique par rapport au piégeage est sa capacité de diffusion, par exemple lors de la bioremédiation, avec une accessibilité des polluants aux microorganismes. Cependant, la détérioration prématurée de la matrice reste problématique, notamment lorsque les microorganismes encapsulés sont relargués. Bien qu'un développement des cellules encapsulées soit observable dans la plupart des cas, une part importante des cellules encapsulées périssent lors du procédé de mise en forme. Cependant, la stratégie d'encapsulation est couramment utilisée car elle permet une variabilité de propriétés ajustable à l'application souhaitée.

## I.2.c L'agrégation

L'utilisation d'une matrice de support, tant bien pour l'adsorption que pour l'encapsulation, implique de nombreux ajustements pour optimiser les interactions entre cellules et support<sup>110</sup>.

La technique d'immobilisation par agrégation est ainsi une stratégie permettant la formation de macroparticules composées de cellules sans besoin d'aucun support<sup>84,85</sup>. Au début des années 1960<sup>111</sup>, la stabilisation d'enzymes rendues insolubles par inter-réticulation, en gardant leur activité catalytique, est rendu possible par la découverte de la réticulation d'enzymes dispersées via la réaction de leur groupement  $\text{NH}_2$  de surface avec des agents de réticulations bifonctionnels tels que le glutaraldéhyde. Les premières utilisations industrielles de ces agrégats dénommés CLECs (*cross-linked enzyme crystals*) ont eu lieu dans les années 1990 par Altus Biologics<sup>112,113</sup> qui utilisait des CLECs de thermolysin (EC 3.4.24.4) pour la production d'aspartame. Ces agrégats réticulés ont montré être plus résistants à la dénaturation par la chaleur, aux solvants organiques que les équivalents en solution, avec une activité conservée<sup>112,114</sup>



**Figure I-4:** Schéma de préparation de cryogel, par l'assemblage de cellules, de polymères et d'agent de réticulation, structurés par congélation. La réaction entre les groupes amino présentés à la surface

*des cellules avec des polymères macromoléculaires se déroule dans la phase non congelée au cours de l'étape de réaction. D'après Zaushitsyna<sup>115</sup>*

Cette technique d'immobilisation est peu utilisée sur des cellules à cause des agents réticulant qui sont toxiques, et l'étape d'agrégation nécessite des procédés de mise en forme souvent délétère pour les cellules. Cependant Kirsebom et al.<sup>116</sup> ont développé une méthode de structuration par agrégation avec des cellules, en formant un cryogel de cellules qui est ensuite réticulée par glutaraldéhyde. Cependant cette technique ne permet pas de conserver la viabilité des cellules<sup>117</sup>. Börner et al. ont alors développé une méthode à partir d'agents réticulants plus adaptés aux contraintes physiologiques de cellules<sup>118</sup>. En formant un cryogel à partir de *Clostridium acetobutylicum* et d'un mélange de réticulant de toxicité faible – à partir de dextran oxydé de haute masse moléculaire, d'alcool polyvinylique modifié par des fonctions aldéhyde et de polyéthylèneimine également modifié par des fonctions aldéhyde – la production d'acétone-butanol-éthanol par ces cellules immobilisées a été multiplié par 2,7 comparée aux cellules en suspension<sup>115</sup>. Ces cryogels sont aussi utilisés pour d'autres applications telles que la dépollution (dégradation du phénol), en utilisant des cryogels encapsulant des bactéries des genres *Pseudomonas*, *Rhodococcus* ou *Acinetobacter*.<sup>119,120</sup>. Les avantages d'une telle technique sont la grande concentration de cellules, une bonne diffusion ainsi qu'une bonne stabilité dans le temps<sup>117,119</sup>. Cependant cette technique prometteuse ne permet pas de protéger les cellules du milieu extérieur et se doit d'être utilisé *ex situ* dans un environnement contrôlé tel qu'un bioréacteur. Les cellules sont en effet exposées aux conditions potentiellement délétères du milieu d'application<sup>121,122</sup>.

#### I.2.d Matériaux pour l'encapsulation

Comme il a été mentionné précédemment, le choix des matériaux d'encapsulation est capital. En fonction de la nature de la matrice, différentes techniques d'encapsulation seront possibles. Ainsi, pour une application de bioremédiation, les matériaux formant les matrices d'encapsulation se doivent d'être insolubles, non toxiques et biocompatibles (les cellules doivent garder leur activité biocatalytiques sans perturbation majeure de leur métabolisme)<sup>101</sup>, peu cher et facile à mettre en oeuvre<sup>93</sup>. Elles doivent de plus permettre l'encapsulation d'une grande quantité de microorganismes – comparable à l'efficacité d'encapsulation – ainsi qu'avoir une bonne stabilité physique, biologique et chimique<sup>123,124</sup>. Une diffusion optimale des nutriments et des polluants est aussi attendue. Les matrices peuvent aussi être non polluantes et

biodégradables pour certains cas particuliers où un relargage des microorganismes n'est pas problématique<sup>87</sup>. Cependant, dans une majorité de cas où ce relargage des cellules encapsulées n'est pas souhaitable, des matrices non biodégradables seront préférées, et pourront potentiellement être réutilisées<sup>93</sup>.

Il existe trois familles de matériaux pour l'encapsulation : Les matrices organiques, les matrices inorganiques et les matrices hybrides.

#### *1.2.d.i Matrices inorganiques*

De nombreux organismes ont été encapsulés dans des matrices inorganiques telles que des carbonates<sup>125</sup> ou des oxydes métalliques<sup>126</sup>. Cependant le matériau inorganique le plus utilisé reste la silice<sup>102</sup>. Les oxydes de silicium sont en effet des minéraux les plus présents dans le sol mais aussi présents de manière organisée dans certains êtres vivants tels que les diatomées<sup>127</sup>. L'encapsulation dans la silice se fait par procédé sol-gel, qui correspond à la polymérisation de précurseurs – des alcoxydes de silicium ou les silicates en solution – pour former une structure tridimensionnelle branchée donnant lieu à un gel hydraté<sup>128</sup>. L'avantage de ces matrices à base de silicium réside en leurs voies de synthèse (sol-gel), qui peuvent se faire en condition douces (température ambiante)<sup>129</sup>. Bien que pendant l'étape de formation du gel (l'hydrolyse et la condensation) des alcools soient formés et induisent une toxicité, de nombreuses recherches ont été menées pour contourner ce problème en modifiant les précurseurs ou les étapes du procédé<sup>130-132</sup>. Grâce à ces conditions et à sa cyto-compatibilité, différentes cellules ont pu être encapsulées telles que des levures<sup>100</sup>, des algues<sup>133</sup> et des bactéries<sup>102</sup>. La solidité de ces matrices permet leur application dans une grande variété de conditions. De plus, leurs procédés de mise en forme et propriétés physiques (mécaniques, optiques, de diffusion) peuvent facilement être adaptés<sup>134</sup>. Finalement, toutes ces caractéristiques font de ces gels inorganiques de bons candidats pour l'encapsulation en vue d'une application dans la bioremédiation<sup>135</sup>.

#### *1.2.d.ii Matrices organiques*

Une autre approche, très différente de l'utilisation des procédés sol-gel et des matériaux inorganiques, est l'utilisation de matériaux organiques tels que les polymères. Il existe deux sous catégories de polymères utilisés : les polymères synthétiques – tels que le poly(vinyle alcool) (PVA), les polyuréthanes et les acrylamides – et les biopolymères d'origine naturelle – tels que la chitine, l'alginate ou le carraghénane<sup>136</sup>. Les polymères synthétiques forment des matrices qui sont robustes, avec de bonnes propriétés mécaniques mais peuvent être cytotoxiques pour les microorganismes<sup>93,137</sup>. Au contraire, les biopolymères ont généralement

une plus faible résistance mécanique mais ont tendance à être biocompatibles, non toxiques pour les microorganismes et plus respectueux de l'environnement<sup>2</sup>. Les biopolymères sont donc particulièrement intéressants pour l'encapsulation de microorganismes. La plupart des biopolymères utilisés couramment sont des polysaccharides ou des protéines. Cependant, la provenance naturelle des polysaccharides, implique des variations dans leur composition bien que leur structure soit généralement connue. Par ailleurs les techniques d'extraction et de traitement ont aussi un impact sur la structure ou la longueur de ces polysaccharides (modifiant certaines propriétés physiques telles que la viscosité).

**Tableau I-1:** Source et application des biopolymères les plus communément utilisés. D'après Christoph<sup>103</sup>.

Type	Polymère	Origine	Application	Réf..
<b>Polysaccharides</b>				
Anioniques	Alginate	Algues brunes	Alimentaire, biomatériaux	138,139
	Carraghénane	Algues rouges	Alimentaire, cosmétiques	140
	Pectine	Fruits (citrons, pommes, betterave)	Alimentaire, biomédecine	141,142
	Xanthane	Bactérie	Alimentaire, pharmaceutique	143,144
Cationiques	Chitine	Crustacés	Alimentaire, biomédecine	145,146
	Chitosane	Dérivés de la chitine	Alimentaire, pharmaceutique	145,146
Neutres	Cellulose	Paroi cellulaire de plantes	Industrie papetière, biomédecine	147,148
	Amidon	Maïs, blé, pommes de terre	Alimentaire, pharmaceutique	149,150
	Agar	Algues rouges	Alimentaire, microbiologie	140
<b>Protéines</b>				
	Collagène	Animal (bétail, porc)	Biomédecine	151,152
	Gélatine	Dérivé du collagène	Alimentaire, biomédecine	153,154
	Fibroïne	Soie (larves de papillons, araignées)	Biomédecine, textiles	155,156
	Zéine	Maïs	Textiles, revêtement	157
<b>Polyphénol</b>				
	Lignine	Bois	Industrie papetière, chimie	158
<b>Polyisoprène</b>				
	Caoutchouc	Hévéa	Automobile, bien de consommation	159



Il est intéressant de noter que les biopolymères sont naturellement désignés comme matériel de support<sup>4,160-162</sup>. En effet, les polysaccharides se trouvent par exemple dans les murs des cellules végétales ou ils jouent un rôle mécanique<sup>163</sup> ou bien autour de bactéries (appelés alors exo-polysaccharides ou capsule) jouant un rôle protecteur et d'ancrage (notamment à travers la formation de biofilms pour les bactéries)<sup>164</sup>. Les protéines quant à elles peuvent jouer le rôle de matrice extracellulaire, récoltables à partir de sources animales. Les biopolymères sont donc des candidats idéaux pour l'encapsulation de microorganismes.

Le polymère le plus utilisé dans l'encapsulation de microorganismes est un biopolymère : l'alginate<sup>162,165</sup>. L'alginate est un biopolymère naturel anionique qui peut être extrait de différents organismes tels que des bactéries (*Azobacter vinelandii* et certaines espèces de *Pseudomonas*) et des algues – dont la principale source utilisée est l'algue brune. L'alginate est un excellent candidat pour l'encapsulation car son procédé de gélification – par l'utilisation d'ion divalents tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Ba}^{2+}$  – a lieu dans des conditions douces, c'est-à-dire à température ambiante et avec des agents de réticulation biocompatibles, et est considéré comme non-toxique et facilement adaptable<sup>166</sup>. Ainsi son utilisation comme matrice d'encapsulation dans le domaine de la bioremédiation a été largement reportée<sup>167-171</sup>.

#### *1.2.d.iii Matrices hybrides*

Cette dernière approche d'encapsulation consiste en l'utilisation de matrices combinant des composés organiques et inorganiques. Les matériaux hybrides sont considérés comme étant un mélange de composant à l'échelle nanométrique ou moléculaire. L'avantage des matériaux hybrides est le large panel de combinaisons possibles de composés et techniques, qui offre alors une large gamme d'ajustements possibles pour maximiser la survie et l'activité cellulaire des espèces encapsulées<sup>172,173</sup>. Le contrôle de la gélification des deux parties est alors primordial pour contrôler les propriétés finales. La combinaison la plus communément utilisée est celle du biopolymère d'alginate (grâce à ses propriétés de biocompatibilité, sa facilité d'utilisation notamment pour la gélification et son moindre coût) et la silice<sup>174</sup>. Elle est utilisée pour l'encapsulation de différentes cellules telles que des bactéries<sup>175</sup>, des champignons et des microalgues<sup>176</sup> et des cellules animales<sup>177</sup>. Des encapsulations de bactéries dans des matrices hybrides alginate-silicate ont été étudiés pour la bioremédiation<sup>109,178</sup> avec des résultats prometteurs.

#### *I.2.d.iv Conclusion*

L'obtention d'un matériau cellularisé, pour des applications en bioremédiation, repose sur l'utilisation de stratégies d'immobilisations variées, dont l'encapsulation qui figure parmi les plus prometteuses. Cette stratégie propose de piéger les cellules lors de la formation des matrices, en structurant le matériau autour des microorganismes. Bien qu'une partie des cellules puissent être endommagées lors du procédé, leur encapsulation permet une protection accrue face aux nombreux stress liés au milieu, améliorant ainsi leur survie lors de l'application. De plus les procédés d'encapsulation permettent la structuration de polymères biocompatibles en garantissant une bonne diffusion et viabilité. Parmi les nombreuses techniques d'encapsulation existantes, le freeze casting a retenu notre attention. Cette technique remplit en effet toutes les conditions décrites précédemment mais permet, de plus, la structuration de blocs macroscopiques avec un procédé de fabrication peu coûteux tant économiquement qu'écologiquement et facilement applicable.

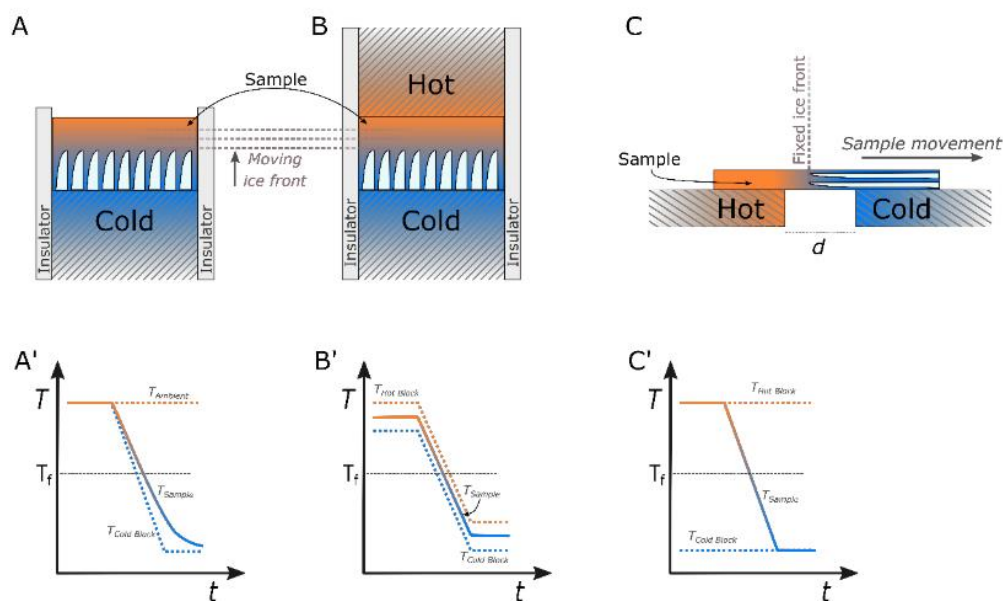
### **I.3 Freeze-casting**

Le freeze-casting – aussi appelée *ice-templating* et congélation directionnelle selon le domaine d'application – est une technique de structuration utilisant la cristallisation du solvant d'une solution ou suspension, pour former des matrices poreuses, avec comme particularité d'induire des pores fortement anisotropes<sup>179,180</sup>. En plus d'un contrôle de la morphologie, ce procédé permet de modifier les propriétés physiques du matériau – tels que la résistance mécanique<sup>181,182</sup>, le module élastique<sup>160</sup> ou les conductivités électrique<sup>183</sup> et thermique<sup>184</sup> – selon les besoins de l'application.

#### **I.3.a Principe du Freeze-casting**

Le freeze-casting est un procédé qui permet la structuration de matériaux par le contrôle de la croissance de cristaux d'un solvant. Le principe du freeze-casting est en effet de congeler une solution, ou une suspension de particules, grâce à l'application d'un gradient thermique où la diminution de la température dépasse le seuil de cristallisation du solvant. En contrôlant différents paramètres, le solvant va cristalliser et induire une ségrégation de phase où les solutés (ou particules) vont se retrouver concentrés entre ces cristaux, formant ainsi les futures parois de la matrice. Après une étape de sublimation de la glace, une matrice poreuse sera obtenue avec des pores ayant la morphologie des cristaux, c'est-à-dire avec un grand facteur de forme (caractérisant l'importance de l'anisotropie) suivant le gradient thermique.

Un des avantages d'une telle technique est le contrôle de la morphologie des pores qui est ajustable grâce à la maîtrise de la nucléation et de la croissance des cristaux du solvant. Cependant, même si des études cherchent à utiliser la nucléation comme levier de contrôle de la macrostructure (par exemple en contrôlant la chimie de surface du substrat de nucléation ou sa conductivité thermique)<sup>185,186</sup>, la majorité des travaux et applications limitent l'influence de cette nucléation, qui est difficile à maîtriser<sup>187</sup>. Au contraire, l'étape de croissance des cristaux est facilement adaptable grâce à la maîtrise du gradient thermique et permet plus de liberté sur la morphologie finale. Le caractère anisotrope des pores est en effet directement lié à la croissance des cristaux contrôlée par le gradient thermique. Ainsi la gestion d'un tel gradient va permettre la formation d'un front de cristallisation – appelé aussi front de glace dans les cas où le solvant utilisé est l'eau – ayant un fort impact sur la taille des pores<sup>188</sup>. Cependant d'autres paramètres importants sont à prendre en compte pour la morphologie tels que la nature des solutés et des particules, la conductivité thermique et composition de la phase ségréguée, la densité de la mixture, sa viscosité<sup>179</sup>. Cependant, l'utilisation de l'ajustement de la composition du mélange initiale pour contrôler le front de glace a aussi un fort impact sur les caractéristiques des parois du matériau final.



**Figure I-5:** Schéma des montages couramment utilisés pour le freeze-casting. A) Configuration de congélation à élément thermique unique, B) Configuration de congélation à double élément thermique et C) Congélation directionnelle 2D. A', B' et C' représentent l'évolution des températures caractéristiques (élément froid, élément chaud et un point arbitraire dans l'échantillon) au cours du temps pour les configurations A, B et C, respectivement. D'après Qin<sup>189</sup>.

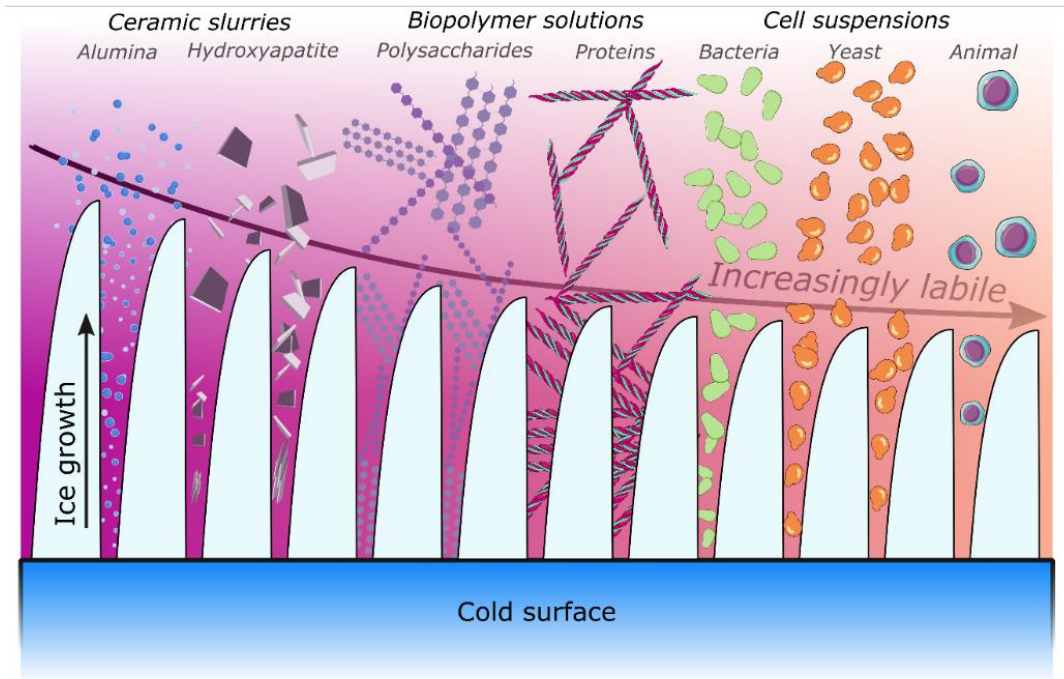
Afin d'appliquer un gradient thermique induisant la formation d'un front de cristallisation, différentes installations sont possibles. Un moyen simple de former un gradient thermique pour

le freeze-casting est de plonger, à vitesse contrôlée, l'échantillon dans une solution réfrigérante – le plus couramment de l'azote liquide en ébullition. Cependant cette technique restreint les possibilités de contrôle du front de cristallisation par la température de refroidissement qui est fixe. Ainsi une autre méthode de freeze-casting répond à ces limitations par un meilleur contrôle de la température en utilisant une résistance chauffante fixée sur une tige de métal conductrice qui est plongé dans la solution réfrigérante. L'échantillon est alors placé dans un moule placé sur une extrémité d'une tige conductrice, où le gradient de température est contrôlé. Au contact de la tige, la nucléation de cristaux va avoir lieu et leur croissance se fera le long du gradient ainsi appliqué. De nombreux dispositifs de freeze-casting ont été mis au point<sup>189-191</sup> avec par exemple un double contrôle de température (par le bas et le haut de l'échantillon) ou encore des montages très différents où l'échantillon est mobile et le front de cristallisation fixé, permettant ainsi un contrôle plus fin de vitesse de la croissance des cristaux.

Le choix du solvant est primordial car il est à la fois responsable de la stabilité des suspensions et solutions, mais aussi des conditions de cristallisation – température de congélation, pression, morphologie des cristaux formés – et définissant ainsi la structure finale obtenue<sup>192</sup>. De plus, l'étape de sublimation, qui peut être critique dans certains cas, est fixée par les propriétés du solvant. Ainsi les solvants les plus utilisés sont le camphre (possédant une température de cristallisation ( $T_{\text{fus}}$ ) entre 44°C et 48°C avec une morphologie en dendrite de ses cristaux), le tert-butyl alcool ( $T_{\text{fus}}$  de 23,5°C et des cristaux prismatiques) et enfin l'eau –  $T_{\text{fus}}$  de 0°C, avec une morphologie dendritique et lamellaire. Le solvant idéal pour l'encapsulation de cellules dans des biomatériaux à travers cette technique est l'eau, pour sa non-toxicité (contrairement à certains solvant inorganiques), son abondance et son prix.

### I.3.b Évolution et applications du freeze-casting

La technique du freeze-casting est aujourd'hui utilisée dans de nombreux domaines grâce à sa polyvalence, autant par le fin contrôle de la morphologie que par la variété de matériaux utilisables<sup>193</sup>. Bien que chaque matériau possède ses propres particularités et contraintes d'applications, le principe de cette technique de structuration grâce aux cristaux reste identique. Les différents domaines où des matériaux structurés par freeze-casting sont utilisés sont : la structuration de céramiques haute performance<sup>194</sup>, le stockage d'énergie<sup>195,196</sup>, la fabrication de capteurs piézoélectriques<sup>197,198</sup> et plus récemment dans la culture cellulaire 3D<sup>189,199</sup> et l'ingénierie tissulaire<sup>200,201</sup> ou encore la dépollution (sous forme d'absorbant)<sup>202</sup> et l'encapsulation pour la cryopreservation<sup>4,203</sup>.



**Figure I-6:** Représentation de la maturité de la technique du freeze-casting en fonction des matériaux structurés. De gauche à droite : des boues céramiques telles que l'alumine ou l'hydroxyapatite, des solutions de biopolymères telles que des polysaccharides et des protéines, et des suspensions cellulaires telles que des bactéries, des cellules de levure et des cellules animales sont piégées dans l'espace interstitiel défini par des cristaux de glace. La hauteur des cristaux de glace indique la maturité respective des matériaux développés. D'après Qin<sup>189</sup>.

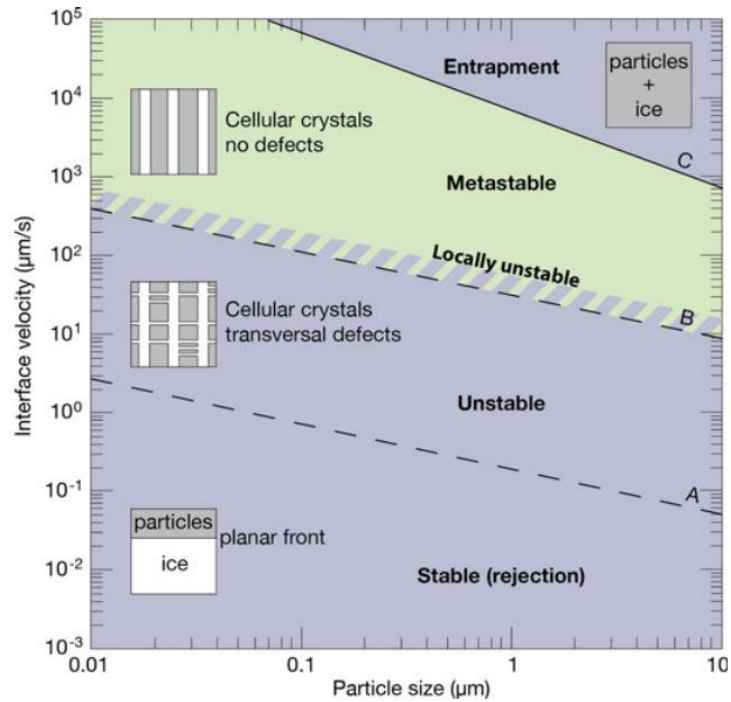
Les premières utilisations de la technique de congélation directionnelle appliquées aux biomatériaux tels que le chitosane et le collagène sont reportées dès les années 1999-2000<sup>204,205</sup> (comme matrice 3D pour l'ingénierie tissulaire). Cependant son développement a principalement été axé sur la structuration de matériaux céramiques. On peut par exemple évoquer l'utilisation d'alumine pour la structuration de membranes d'ultrafiltration<sup>206</sup>, d'oxydes de nickel et de zirconium pour la formation de piles à combustible à oxyde solide<sup>207</sup> ou encore des isolants thermique<sup>208</sup> à partir de céramiques composites silicate/SiN<sub>4</sub><sup>209</sup> ou Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub><sup>210</sup>. L'utilisation d'alumine<sup>211,212</sup> et d'hydroxyapatite<sup>213</sup> se fait aussi pour la formation de matériaux mimant la structure de la nacre<sup>212,214</sup> et de l'os<sup>211,215</sup>. L'hydroxyapatite est ainsi utilisé pour des applications biomédicales de régénération osseuse<sup>215,216</sup>.

L'utilisation de la technique de freeze-casting s'est ensuite progressivement redirigé vers les nombreux matériaux de la famille des polymères (aussi bien synthétiques que biosourcés). La majorité de ces polymères sont initialement en solution dans l'eau et se trouvent dans la catégorie dit d'*ice-templating*<sup>190</sup>. On peut évoquer par exemple la création de matériaux mimant la nacre à partir de polymères synthétiques (poly(N,N-isopropylacrylamide)) et

d'argile<sup>182</sup> ou l'utilisation de chitosane comme support de minéralisation pour de la nacre synthétique<sup>217</sup>. Par ailleurs on peut aussi reporter l'utilisation de polyacrylamide pour la purification et désalinisation de l'eau<sup>218</sup> ou encore la fabrication de bois synthétique à partir de phénol-formaldéhyde avec des propriétés améliorées<sup>219</sup> (telle qu'une meilleur résistance mécanique, aux acides et au feu).

Cependant, l'utilisation de biopolymères se fait principalement dans le domaine biomédical car la structure poreuse et anisotrope obtenue est particulièrement utile pour la croissance orientée de cellules<sup>220,221</sup>. Dans le domaine du freeze-casting, le biopolymère le plus utilisé est la cellulose<sup>184,222-224</sup> car il est abondant et facilement fonctionnalisable<sup>190</sup>, utilisable par exemple comme absorbant<sup>225</sup> ou support biomédicaux<sup>226</sup>. Le deuxième biopolymère le plus utilisé est le chitosane, il est peu cher aussi (car souvent dérivé des déchets de l'industrie des fruits de mer)<sup>190</sup>, non-toxique, résistant et a été utilisé comme support d'implant osseux et de stents<sup>173,227</sup>. D'autres biopolymères sont ainsi utilisés comme l'alginate<sup>228</sup>, le collagène<sup>199,229</sup>, la pectine<sup>103,160</sup> ou encore la fibroïne<sup>155,230</sup>.

Lors du procédé de freeze-casting, des particules de tailles variées peuvent être utilisées. Cependant, en fonction de la taille des particules, leur devenir est assez différent<sup>179,231</sup>. En effet les petites molécules et particules nanométriques se retrouvent systématiquement rejetées par la glace ou confinées entre les cristaux car non miscibles avec ces cristaux purs<sup>189,192,232,233</sup>. Cependant si leur taille devient de l'ordre de grandeur du micron, différents scénarios peuvent subvenir : soit elles sont piégées dans la glace, soit elles sont repoussées par le front, soit elles sont encapsulées entre les cristaux<sup>192,234,235</sup>. Le phénomène de ségrégation qui définit le procédé de freeze-casting peut être ainsi utilisé pour encapsuler des particules et molécules d'intérêt (telles que des médicaments, principes actifs ou cellules), qui se trouvent alors emprisonnés dans les murs par le contrôle de la vitesse du front de glace. Pour des applications de bioremédiation des bactéries peuvent être utilisées, comme nous l'avons vu plus tôt, et étant de l'ordre de grandeur du micron, leur comportement et leur devenir lors du procédé de freeze casting peuvent être comparés à ceux des particules en suspension de tailles analogues.



**Figure I-7:** Diagramme général de stabilité et de structure pour la solidification de suspensions colloïdales. Les zones vertes correspondent aux conditions optimales pour la congélation de cellules. D'après Deville<sup>236</sup>.

### I.3.c Microorganismes et congélation

Comme nous venons de le voir, la technique du freeze-casting est adaptée pour structurer des biopolymères – souvent utilisés dans l'encapsulation de microorganismes – et leur prodiguer une morphologie qui peut être idéale pour l'absorption et le transport de liquides<sup>160</sup>. De plus elle permet l'encapsulation de particules entre les cristaux et utilise couramment l'eau comme solvant, ce qui est avantageux pour l'encapsulation d'entités biologiques. Cependant, ce procédé utilisant des températures négatives, la problématique de la cryopréservation doit être abordée. De plus il n'existe que peu de travaux sur l'encapsulation de microorganismes via cette technique de freeze-casting.

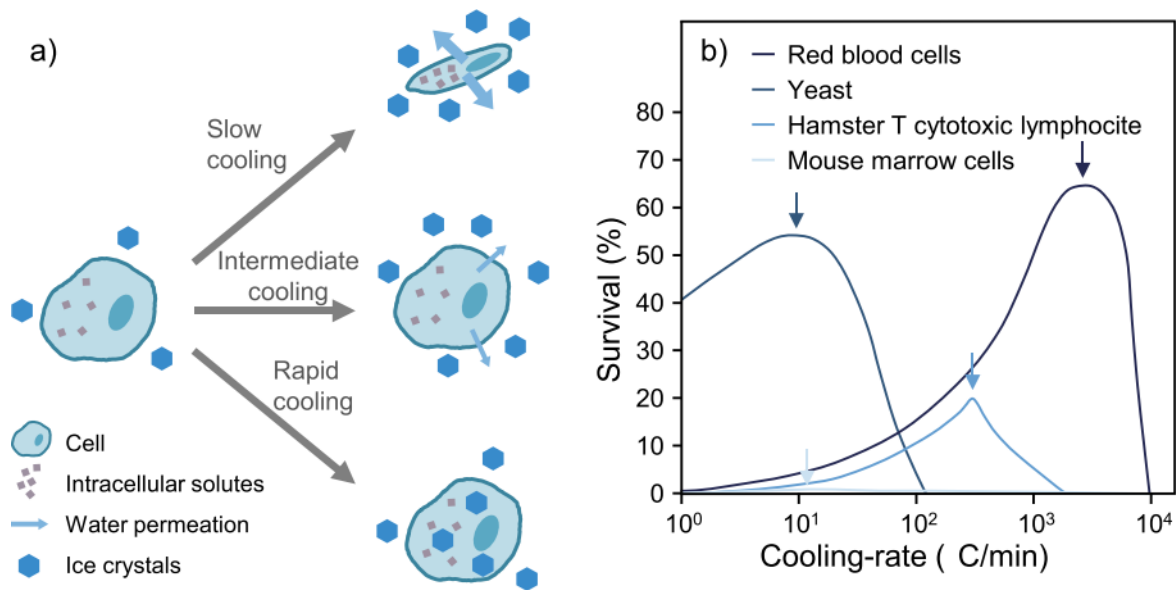
#### I.3.c.i Cryopréservation

Bien que la congélation puisse entraîner la mort pour une grande partie des êtres vivants, elle peut cependant aussi être synonyme de préservation<sup>237</sup>. Les conditions optimales pour la survie des microorganismes congelés ont été formulées à travers de l'hypothèse à deux facteurs par Mazur *et al.* en 1972<sup>238</sup>. Ainsi, lors de la congélation d'organismes, deux facteurs ont été identifiés comme principales cause mortalité : la formation de cristaux de glace intracellulaire et une altération des solutions intra et extracellulaires. En effet, la formation de glace intracellulaire cause des dommages structurels définitif aux microorganismes et peut aussi être

observées lors de la décongélation. L'altération des solutions intra et extracellulaires cause, quant à elle, une déshydratation brutale des cellules due à l'augmentation de la concentration en solutés dans le microenvironnement des cellules – par le phénomène de ségrégation de phase (ou au contraire une réhydratation brutale lors de la décongélation). Les membranes cellulaires jouent alors un rôle vital par leur perméabilité qui régulent les événements physiques intracellulaires (dont la pression osmotique) et sont de plus les premiers sites de lésion observés lors de la congélation de cellules<sup>237</sup>. Lors de la congélation, les premiers cristaux se forment dans la solution. En effet, les cellules, par leur composition interne, induisent un abaissement cryoscopique de l'eau et retardent la nucléation de glace intracellulaire. Ainsi lors de leur déshydratation, les cellules augmentent leur concentration en soluté interne et décalent encore la surfusion et la nucléation de glace. Lorsque des cellules sont congelées, leur réponse biologique et physique à cette diminution de température est donc une combinaison entre déshydratation et changement d'état de l'eau<sup>238</sup> et sont donc des leviers utilisables pour améliorer leur survie.

Une des stratégies les plus couramment employée est l'utilisation de cryoprotecteurs. Décrit pour la première fois en 1949<sup>239</sup>, l'utilisation de glycérol comme agent de cryoprotection (ACP) à permis de préserver des cellules spermatiques d'oiseaux dans l'état congelé et de garder leur mobilité après décongélation. D'autres ACP furent ensuite découverts tels que le diméthyle sulfoxyde<sup>240</sup>, l'éthylène glycol<sup>241</sup> et le erythriol<sup>242</sup>. L'ajout d'ACP permet de diminuer la température de cristallisation diminuant ainsi la formation de glace intracellulaire. De plus, en pénétrant dans les cellules les molécules d'ACP diminuent l'impact de la pression osmotique croissante grâce à leur grand volume molaire ce qui minimise la contraction cellulaire<sup>243</sup>. Ainsi une concentration suffisante de cryoprotecteurs permet de prévenir les dommages liés à une rétractation critique des cellules due à la déshydratation osmotique lors de la croissance de glace extracellulaire, et de contrôler la formation de glace intracellulaire. Cependant leur efficacité dépend de leur capacité à pénétrer dans les cellules ainsi que de leur cytotoxicité.





**Figure I-8:** Impact de la vitesse de descente en température sur la survie des cellules et fonction des différents phénomènes de cristallisation. (a) Une vitesse de refroidissement élevée induit la formation de glace intracellulaire alors qu'une vitesse lente cause une déshydratation cytotoxique. (b) Une vitesse de refroidissement optimale peut être obtenue dépendamment de la nature des cellules. Adapté de Mazur et Pegg<sup>238,244</sup>, d'après Christoph<sup>103</sup>.

Une stratégie complémentaire est le contrôle de la vitesse de refroidissement. Une partie des dommages survient lors de la déshydratation (avec la pression osmotique ainsi que par l'état de rétraction final) et le contrôle d'une telle cinétique peut améliorer la viabilité<sup>245</sup>. Si la vitesse de descente en température est assez élevée, et si la solution intracellulaire est suffisamment concentrée, elle devrait se vitrifier lorsque la température continue de diminuer.<sup>243</sup> Cependant si la vitesse de refroidissement est trop lente (pour un organisme donné), l'eau présente dans la cellule peut sortir à travers la membrane et cristalliser en dehors de la cellule. Comme mentionné précédemment, la déshydratation qui survient peut-être trop importante et le rétrécissement de la cellule fatale. De plus, si la vitesse de refroidissement est trop rapide, l'eau ne peut pas sortir de la cellule à temps et va cristalliser de manière intracellulaire ce qui entraîne la mort cellulaire. Il y a alors un optimum de vitesse de refroidissement qui permet de minimiser la déshydratation et la formation de cristaux intracellulaire. Cependant cet optimum est dépendant du type de cellules car fortement relié aux propriétés de la membrane ainsi qu'à la composition interne des organismes. Il dépend ainsi de la perméabilité de la membrane aux cryoprotecteurs, de sa résistance vis-à-vis de la déshydratation, de la concentration de ACP nécessaire pour atteindre un état vitreux et de la concentration à laquelle les ACPs deviennent toxiques<sup>246,247</sup>.

La vitrification totale est aussi envisageable. En ayant des concentrations initiales très élevées en ACP il est possible d'empêcher toute nucléation de cristaux. Cependant la toxicité et l'élimination post congélation des cryoprotecteurs sont des limites à cette technique<sup>248,249</sup>.

Une autre stratégie consiste en l'utilisation de polymères non pénétrant. Pendant que les premiers cristaux se forment dans la solution, ils vont être concentrés et leur viscosité va augmenter, diminuant ainsi la diffusion et la mobilité de l'eau depuis les cellules vers les cristaux. Ainsi, la déshydratation est ralentie et à un certain point totalement arrêtée lorsque la solution extracellulaire devient vitreuse (les polymères avec une température de transition vitreuse,  $T_g$ , vers  $-20^{\circ}\text{C}$  fournissent une survie maximale)<sup>250</sup>. De par leur masse moléculaire élevé, les polymères sont les meilleurs agents vitrifiant extracellulaires. Lorsque l'abaissement cryoscopique induit par la concentration progressive du milieu intracellulaire n'est plus suffisante, une nucléation intracellulaire est observée. Dans ces cas, si la taille des cristaux formés n'excède pas 300 nm, cette nucléation reste bénigne pour la majorité des cellules. Une limitation de cette méthode est l'utilisation d'ACP complémentaire pénétrant les cellules pour limiter la croissance des *nuclei* et augmenter la survie cellulaire. Cette technique peut être complétée par le contrôle de la vitesse de congélation afin de mieux gérer la vitrification.

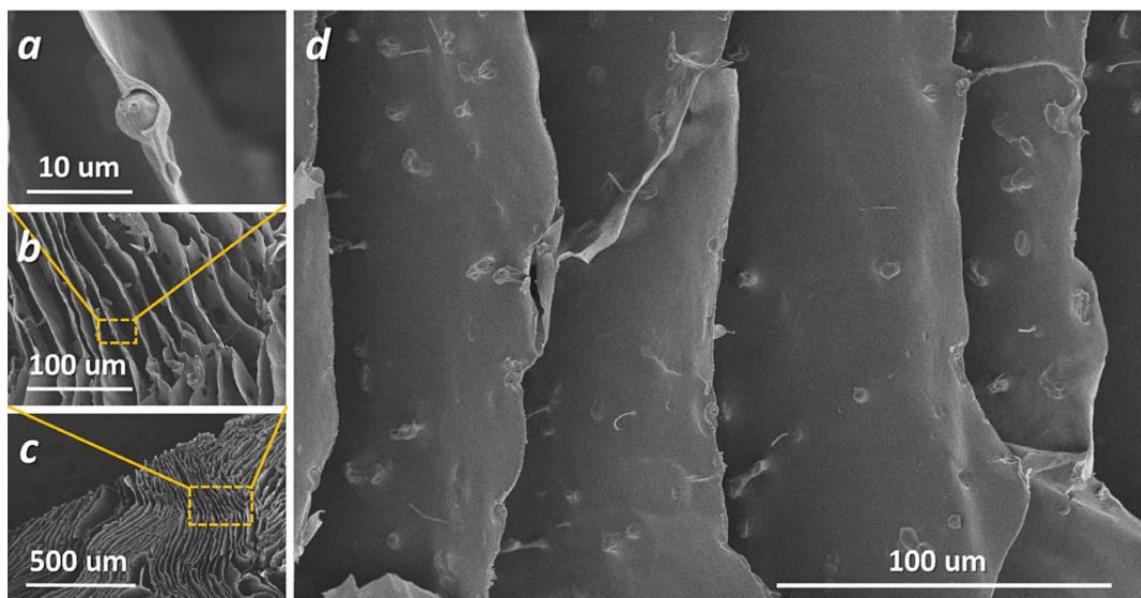
Il existe ainsi différents paramètres et leviers sur lesquels il est possible de jouer pour atteindre l'encapsulation à basse température de microorganismes pour la bioremédiation en conservant leur viabilité et activité. Les paramètres principaux sont donc : le contrôle de la nucléation et croissance de la glace intra et extracellulaire, la cinétique de déshydratation et le contrôle de la décongélation. Les stratégies pour régler ces paramètres sont l'utilisation de cryoprotecteurs – pénétrant dans la cellule ou de haute masse molaire – et le contrôle de la vitesse de refroidissement (et de la vitesse du front de glace pour le cas du freeze-casting).

### *1.3.c.ii Encapsulation par FC*

Comme vu précédemment, lors de la ségrégation de phase du freeze-casting, les petites molécules se retrouvent confinées entre les cristaux. Cependant lorsqu'une taille critique est atteinte (et dépendamment de la vitesse de congélation) différents comportements peuvent être observés<sup>236</sup>. Les cellules, telles que les bactéries, peuvent être considérées comme ayant un comportement analogue à des particules, mais plus souples et déformables<sup>251</sup>. Elle se retrouvent ainsi sujets, contrairement aux petites molécules, autant aux mécanismes de rejet par le front de glace que de piégeage au sein des cristaux et d'encapsulation entre les cristaux, dépendamment de la vitesse du front. Leur devenir dépend ainsi fortement de la vitesse du front de glace mais

aussi des caractéristiques des cellules elles-mêmes – leur taille, densité et chimie de surface – et de la viscosité de la solution de polymères.

Des bactéries ont été ainsi encapsulées par le procédé de freeze-casting dans des céramiques<sup>252</sup>, des murs de nanotubes de carbone<sup>253</sup> et des polymères<sup>203</sup>. L'encapsulation en céramique (pour former des biofiltres dégradant les phénols) par procédé de freeze-casting a été suivie d'une gélification liant de manière irréversible les nanoparticules de SiO<sub>2</sub> aux particules de céramique qui encapsulent les bactéries en présence d'ACP. La matrice ainsi obtenue était robuste et l'étape de séchage (ici une lyophilisation) a permis de stocker sur le long terme les bactéries encapsulées sous forme sèche. Néanmoins les conditions de congélation ne sont pas optimales et la viabilité en est affectée. De plus l'étape de lyophilisation est critique aussi pour la survie des bactéries et une forte mortalité est observée. L'encapsulation en matrices de nanotubes de carbone (pour la formation de piles à combustible microbienne) est réalisée par l'encapsulation de billes de glucose-alginate contenant les bactéries. L'utilisation de bactéries préalablement encapsulées en billes de polymère permet d'outrepasser certains problèmes lors de la congélation, notamment en diminuant l'impact de la déshydratation et en protégeant les cellules de la pression exercée par les cristaux extracellulaires<sup>254,255</sup>.



**Figure I-9:** Clichés MEB de levures encapsulées dans des aérogels d'alginate structurés par freeze casting.

Dans des études récentes réalisé au sein de notre équipe, Sarah Christoph a réussi à encapsuler des levures (*Saccharomyces Cerevisiae*) par procédé de freeze-casting dans de

l'alginate sans utiliser de ACP. Ainsi l'utilisation de biopolymères non toxiques est primordiale car elle diminue les contraintes mécaniques subies mais augmente aussi l'efficacité de l'encapsulation dans les murs<sup>189</sup>.

Il a été ainsi démontré qu'il est possible d'encapsuler des microorganismes tel que des bactéries grâce au procédé de freeze-casting. Cependant certaines questions restent ouvertes tels que l'évolution du microenvironnement des bactéries pendant la congélation et la possible optimisation du procédé pour la viabilité cellulaire.



# **Chapitre II : Freeze-casting et encapsulation**



## Introduction

Comme mentionné dans le chapitre I, la bioremédiation par l'utilisation de microorganismes exogènes est une alternative intéressante face aux techniques physico-chimiques. Leur encapsulation dans des matrices permet d'assurer leur viabilité et efficacité en les protégeant des agressions externes et en leur conférant un microenvironnement adapté à leur survie et activité de biodégradation.

La première question qui se pose alors est : le freeze-casting est-il un procédé adapté pour l'encapsulation de bactéries ? L'hypothèse sous-jacente est que le contrôle de l'environnement des bactéries défini par les paramètres de mise en forme déterminera leur viabilité et donc leur potentiel de biodégradation. Pour y répondre nous commencerons par chercher un système polymère/bactérie utilisable, puis nous étudieront le procédé de freeze-casting notamment à travers les paramètres influençant le contrôle de la morphologie des matrices et leur impact sur le devenir des bactéries.

## II.1 Quelle souche bactérienne et dans quel matériau ?

### II.1.a *Pseudomonas putida*, une espèce pertinente pour la bioremédiation

*Pseudomonas putida* est une espèce de bactéries gram-négative capable de se développer dans différents environnements (milieux aqueux, sols) notamment dans la rhizosphère (sol colonisé par les racines de plantes dans lequel de nombreuses interactions ont lieu) et dans les milieux pollués<sup>256,257</sup>. Cette espèce possède une croissance rapide, une faible demande en nutriments et un métabolisme polyvalent. Sans qu'elle puisse être considérée extrémophile, *P. putida* tolère une large gamme de pH et de température ainsi qu'une haute concentration de substances toxiques et de polluants organiques<sup>258,259</sup>. Cette espèce possède un arsenal d'outils de dégradation (les plus étudiés sont les plasmides TOL pWW0, NAH7 et CAM codant pour des enzymes d'oxydoréductases)<sup>257,260</sup> qui lui permet le catabolisme de nombreux composés aromatiques (HAP) tels que le toluène, le naphthalène et le camphre.

En particulier, la souche *Pseudomonas putida* mt-2 – isolée au Japon en 1961 par Keiichi Hosokawa à partir d'un prélèvement d'un sol pollué, nommée aussi souche ATCC23973 (aussi référencée comme ATCC33105)<sup>261</sup> – a été étudiée de nombreuses fois pour la biodégradation d'hydrocarbures aromatiques et de colorants<sup>257,262-265</sup>.



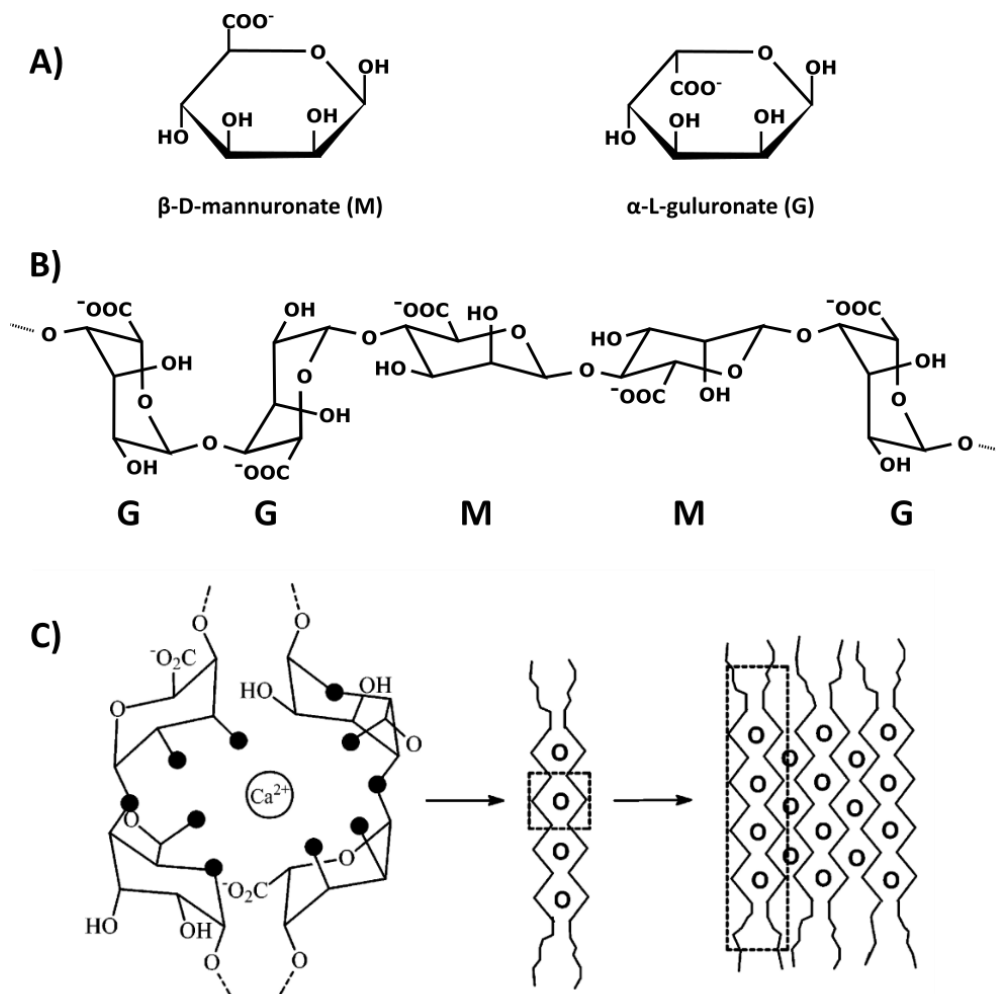
Il est reconnu que les bactéries de type *Pseudomonas* possèdent un microenvironnement composé de polysaccharide, de protéines, de glycoprotéine, de glycopeptides<sup>266</sup>. Cette capsule naturelle autrefois nommée glycocalyx possède des propriétés essentielles à la survie des bactéries et leur confère notamment une certaine capacité d'adhésion utilisé par ailleurs pour la formation de biofilm<sup>90,267,268</sup>. De plus, lors de stress hydriques, les *Pseudomonas* (dont les *P. putida* mt-2) produisent et externalisent des exo-polysaccharides (EPS) tels que l'alginate et la cellulose qui leur permettent de conserver une hydratation locale et une meilleure résistance face aux stress oxydants (ROS)<sup>268,269</sup>.

L'espèce *Pseudomonas putida* est un candidat idéal pour nos études d'encapsulation en vue d'une application de biodégradation de par sa polyvalence tant en résistance qu'en efficacité de dégradation.

### II.1.b L'alginate, biopolymère d'encapsulation par excellence

Comme vu précédemment, les bactéries du genre *Pseudomonas* produisent des exo-polysaccharides pour former des biofilms et comme réponses à certains stress. Parmi ces EPS figure l'alginate, qui permet un contrôle de l'hydratation du microenvironnement autour de ces bactéries et une protection face aux stress oxydants.

L'alginate est principalement extrait des algues marines brunes (*Phaeophyceae*) avec une production industrielle d'environ 30000 tonnes par an<sup>138</sup>. Ce polymère est majoritairement présent dans la matrice extracellulaire de ces algues et joue un rôle de structuration conférant à la fois une résistance mécanique et une certaine flexibilité<sup>270</sup>. L'alginate est un copolymère linéaire naturel composé de deux unités monomères : l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (que nous appellerons M) et l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (appelé par la suite G). Elles sont représentées dans le schéma (A) de la Figure II-1.



**Figure II-1:** Représentation des structures de l'alginate. Les schémas (A) illustre les structures des acides  $\beta$ -D-mannuronique et  $\alpha$ -L-guluronique déprotonnés, les deux unités monomères composant l'alginate. Le schéma (B) représente une conformation de chaîne possible des monomères G et M où un enchaînement d'unité G forme une demi cage (adapté de K. Draget<sup>138</sup>). Le schéma (C) est une représentation hiérarchique de la structure de l'alginate réticulé par des ions calcium. La première échelle est la coordination du calcium dans une cavité (cage appelée « egg-box ») créée par deux successions de deux unités G (intra-chaîne ou inter-chaîne) et les oxygènes représentés en noir sont potentiellement ceux impliqués dans la coordination avec l'ion calcium. La structure suivante représente un dimère de deux chaînes d'alginate reliées entre elles par des « egg-box » et enfin un multimère est représenté regroupant plusieurs chaînes d'alginate réticulées.

Comme la plupart des polymères naturels, la structure de l'alginate peut varier considérablement en fonction de la source, impactant les propriétés physico-chimiques du polymère. Ces différences sont dues à la longueur des chaînes ainsi qu'au ratio entre unités G et unités M. Une des propriétés faisant de l'alginate un des principaux biomatériaux utilisés est sa capacité à gélifier en présence de cations divalents. L'alginate étant couramment employé dans le domaine des matériaux en contact avec le vivant (biomatériaux, matériaux pour la biodégradation, agroalimentaire), le cation le plus utilisé pour réticuler l'alginate est le calcium

pour sa biocompatibilité. Les capacités de gélification de l'alginate sont principalement due aux blocs G qui forment des cages permettant la coordination avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  en formant une structure dite en « egg-box » (de boîte à œuf)<sup>271,272</sup>. Cette structure est représentée par le schéma (C) de la Figure II-1.

Grâce à cette propriété de gélification et à sa biocompatibilité, l'alginate réticulé est très utilisé dans le domaine biomédical (encapsulation et relargage médicamenteux, cicatrisation des plaies, ingénierie tissulaire) et dans l'industrie agroalimentaire<sup>162,273-276</sup>. La gélification et la polyvalence de l'alginate lui permet d'être mis en forme sous différentes géométries telles que des billes<sup>176,277</sup> et des capsules<sup>162,278,279</sup> par un simple bain dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ , la gélification y est rapide et nécessite peu de calcium (un rapport  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{G}] > 0,55$  est suffisant pour former un gel)<sup>272</sup>. D'autres morphologies peuvent être formées telles que les fibres<sup>280</sup>, les revêtements<sup>281</sup> ou bien encore les films<sup>282</sup>. Des gels poreux anisotropes d'alginate ont aussi été obtenus avec leur structuration par congélation directionnelle<sup>103,220</sup>.

## II.2 La congélation directionnelle comme stratégie de structuration

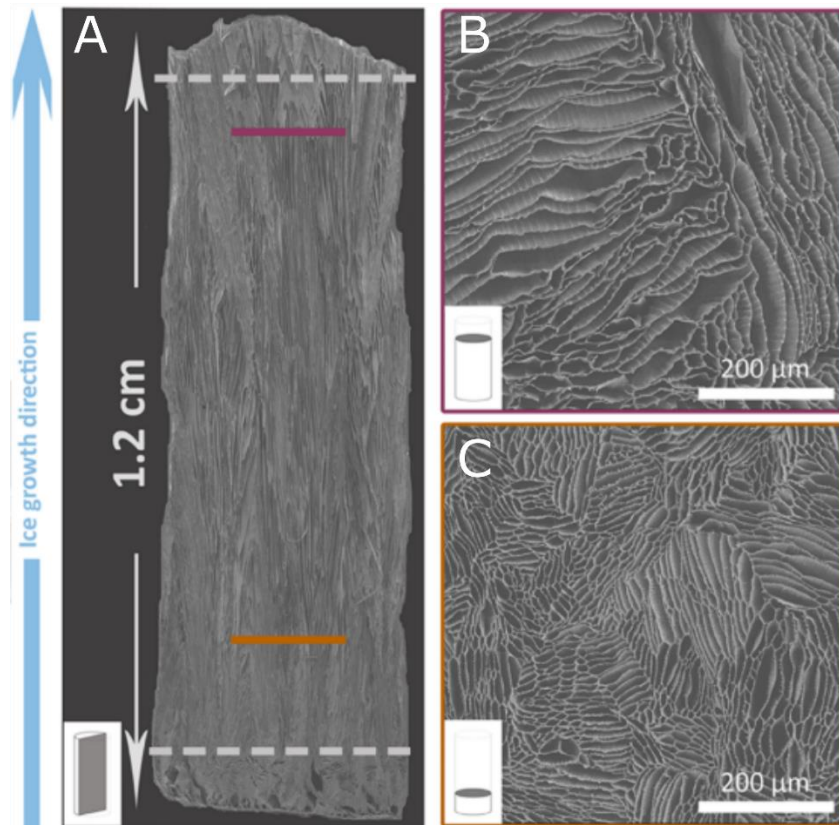
Comme présenté au chapitre précédent, la congélation directionnelle permet la structuration de suspensions précéramiques, métalliques ou de solutions de polymère sous forme de matrices poreuses et anisotropes.

D'après la littérature, différents paramètres permettent d'affiner le contrôle de la morphologie de ces matrices produites par freeze-casting. Les principaux paramètres influençant la structure sont la nature du solvant, la taille de particules et les conditions de congélation<sup>188,213,283-285</sup>. Cependant si l'on souhaite encapsuler des cellules lors d'une structuration par *ice-templating*, le meilleur solvant utilisable est l'eau (car non toxique, très abondant et peu cher) et n'est alors plus un paramètre ajustable.

### II.2.a Contrôle de la vitesse du front de glace

Les matrices structurées par congélation directionnelle réalisées au sein du laboratoire sont structurées par un contrôle de la température par le bas de l'échantillon, permettant ainsi l'application d'un gradient thermique. Cependant d'après des études récentes menées au sein du laboratoire par Rieu *et al.*<sup>199</sup>, lorsqu'une descente constante en température est appliquée (ici  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ ) la taille des pores des matrices obtenues change le long des échantillons (voir Figure II-2). En effet, la distribution de la taille des pores évolue et des pores plus larges sont observés

lorsque la distance à la surface refroidissante augmente. La taille des pores étant directement relié à la taille des cristaux produits durant le procédé, eux même dépendant de la vitesse de congélation, cet élargissement des pores traduit le ralentissement de la vitesse de congélation. Ainsi la vitesse de congélation n'est pas homogène le long de l'échantillon et il faut s'attendre à ce que la survie de cellules encapsulée par freeze-casting en soit de même.



**Figure II-2:** Clichés MEB de matrices de collagène structurées par congélation directionnelle et séchée par lyophilisation. (A) Reconstruction par mosaïque de plusieurs clichés MEB d'une coupe longitudinale prise le long de l'axe de croissance des cristaux. (B) Coupe transversale effectué dans le haut de l'échantillon. (C) Coupe transversale réalisé dans le bas de la matrice. Les deux coupes obtenues à différents hauteurs de l'échantillon mettent en évidence les différences de taille des pores en fonction de la localisation dans l'échantillon.

Afin d'atteindre une viabilité égale – et optimale – tout au long de l'échantillon ainsi qu'un contrôle précis de la morphologie, la première étape de ma thèse a été d'obtenir une vitesse de congélation constante tout au long des matrices. Pour cela nous avons commencé à nous référer à la vitesse de propagation du front de glace qui traduit la vitesse à laquelle les cristaux grandissent et qui est donc un paramètre précis pour décrire la vitesse de congélation. Nous partons aussi de l'hypothèse que l'interaction avec ce front de glace va déterminer de manière

plus précise la viabilité des cellules encapsulées comme mis en évidence par la littérature dédiée à la congélation directionnelle en cryobiologie<sup>255,286,287</sup>.

Pour obtenir ce front de glace à vitesse constante, nous avons utilisé les équations décrites par Stolze *et al.* (Équation II-1). Cette équation permet de calculer les variations de la température à appliquer au bas de l'échantillon pour obtenir une vitesse de progression du front de glace constante dans un montage de freeze-casting analogue à celui utilisé dans notre laboratoire.

$$T(t, z) = T_m + \frac{H}{C_s} - \frac{H}{C_s} * \exp\left(\frac{v_f^2 * \rho_s * C_s}{\lambda_s}\right)$$

#### Équation II-1

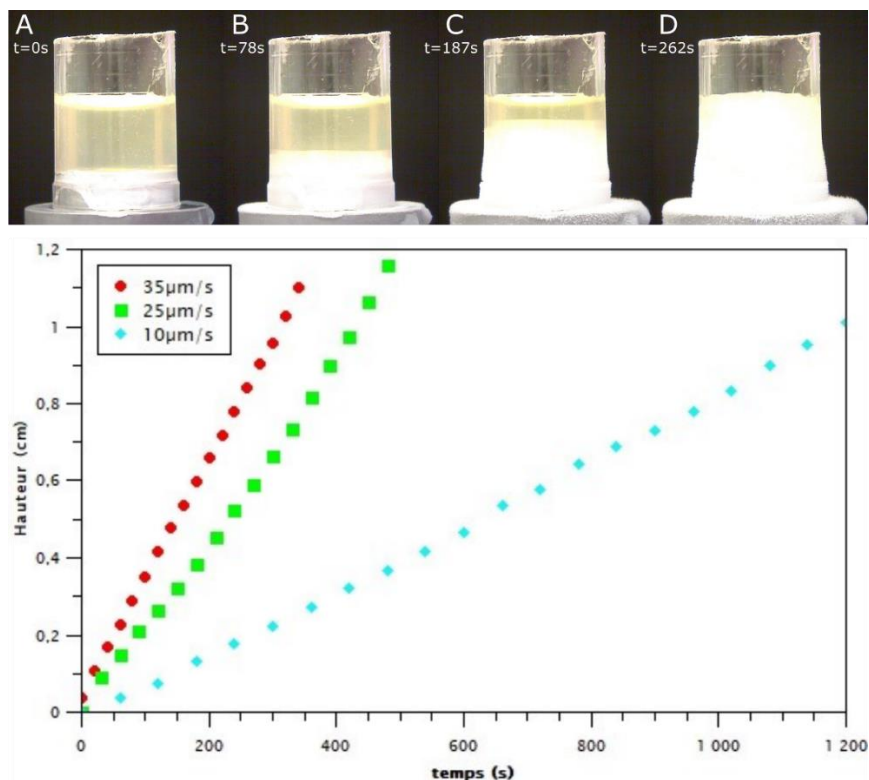
Dans l'Équation II-1,  $T_m$  est définie comme la température de cristallisation de la solution,  $H$  l'enthalpie de cristallisation de la glace et  $C_s$  la capacité thermique spécifique.  $\rho_s$  est la fraction volumique de la glace,  $\lambda_s$  est la conductivité thermique de la partie congelée et enfin  $v_f$  la vitesse du front de glace. Pour appliquer cette équation au contrôleur utilisé pour régler la température de la résistance du montage, il faut segmenter les courbes de température obtenues. En effet, le contrôleur utilisé dans le montage ne peut appliquer que des descentes linéaires en température. C'est pourquoi les courbes obtenues ont été approximées par l'utilisation d'une succession de droites calculées en découpant la courbe d'équation en parties de temps égales.

Pour vérifier l'obtention d'un front de glace à vitesse constante, des vidéos de la progression du front de glace ont été enregistrées lors des expériences de freeze-casting. Une solution d'alginate à 4% a été congelée à différentes vitesses, 10, 25 et 35  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , et la progression du front de glace suivie par vidéo. Les images ainsi obtenues ont ensuite été traitées par le logiciel ImageJ.

#### Matériel et méthode :

Une solution aqueuse à une concentration massique de 4% (notée 4 wt%) d'alginate de sodium est préparée à partir d'alginate de viscosité moyenne (Sigma Aldrich, référence 9005-38-3) et d'eau ultrapure, puis mise sous agitation magnétique à température ambiante ( $T_{amb}$ ) pendant une nuit pour homogénéiser la solution. On prélève 2mL de cette solution et les place dans un tube en polystyrène au sommet de la tige de cuivre plongeant dans l'azote liquide. Différentes vitesses ont été appliquées : 10  $\mu\text{m}/\text{s}$ , 25  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et 35  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Une feuille noire est utilisée comme fond pour contraster avec les cristaux de glace. Un microscope portatif est utilisé pour

mesurer la progression du front de glace. L'analyse se fait via l'utilisation du logiciel ImageJ (Fiji)<sup>288</sup> et les différentes régions sont délimitées par la fonction « Threshold ». Le bas des échantillons n'a pas été pris en compte pour ces analyses car cette zone correspond à la nucléation des cristaux de glace, qui n'est pas contrôlable à cause de la surfusion.



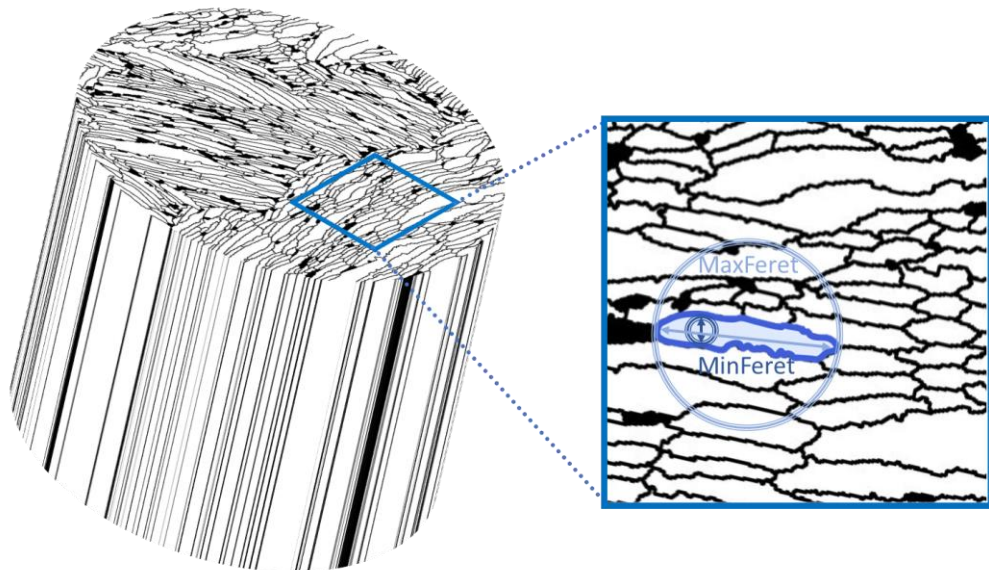
**Figure II-3:** Mesure de la vitesse du front de glace lors de l'utilisation de l'Équation II-1. De A à D les clichés pris par la caméra pour mesurer le front de glace sont représentés, pour la vitesse de  $35 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les résultats des mesures de la progression des fronts de glace à différentes vitesses sont présentés dans le graphique. Hauteur des échantillons : 1,1 cm.

La mesure de l'avancement du front de glace est reportée dans la Figure II-3. Les positions des fronts de glace évoluent linéairement lors de ces expériences. Les valeurs des pentes mesurées sont de 10, 25 et  $35 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , qui correspondent bien à celles imposées. Ainsi l'approximation de la courbe de descente en température (d'après Stolze *et al.*<sup>289</sup>) par des équations linéaires à bien permis d'avoir un contrôle précis de la progression du front de glace.

Toutes les manipulations de congélation directionnelle effectuées lors de cette thèse sont réalisées à partir de ces résultats, avec un contrôle de la vitesse du front de glace, afin d'avoir une structure la plus homogène possible tout le long des matrices.

## II.2.b Impact de la vitesse du front de glace sur la morphologie des pores

Afin de mesurer l'effet de la vitesse du front de glace sur la morphologie, plusieurs matrices ont été structurées par freeze-casting aux trois vitesses précédemment décrites. Une fois les matrices lyophilisées, elles ont été observées par microscopie électronique à balayage (MEB) puis les clichés obtenus ont été traités par ImageJ pour déterminer les facteurs de forme des pores. Les dimensions ainsi reportées (voir Figure II-4) sont le diamètre de Feret – cercle de plus petit diamètre pouvant entourer tout le pore et donne ainsi leur longueur – et le diamètre minimum de Feret – cercle le plus grand pouvant se trouver dans le pore définissant ainsi sa largeur (et ainsi la distance inter-murs).



**Figure II-4:** Schéma des mesures des longueurs et des largeurs des pores sur une image MEB traitée par ImageJ. Le diamètre de Feret maximal est alors le diamètre du cercle de plus petite circonférence possible pouvant contenir le pore : la longueur du pore. Le diamètre de Feret minimal est le diamètre du cercle le plus grand pouvant être contenu dans ce même pore, soit sa largeur (analogue à la distance entre les parois).

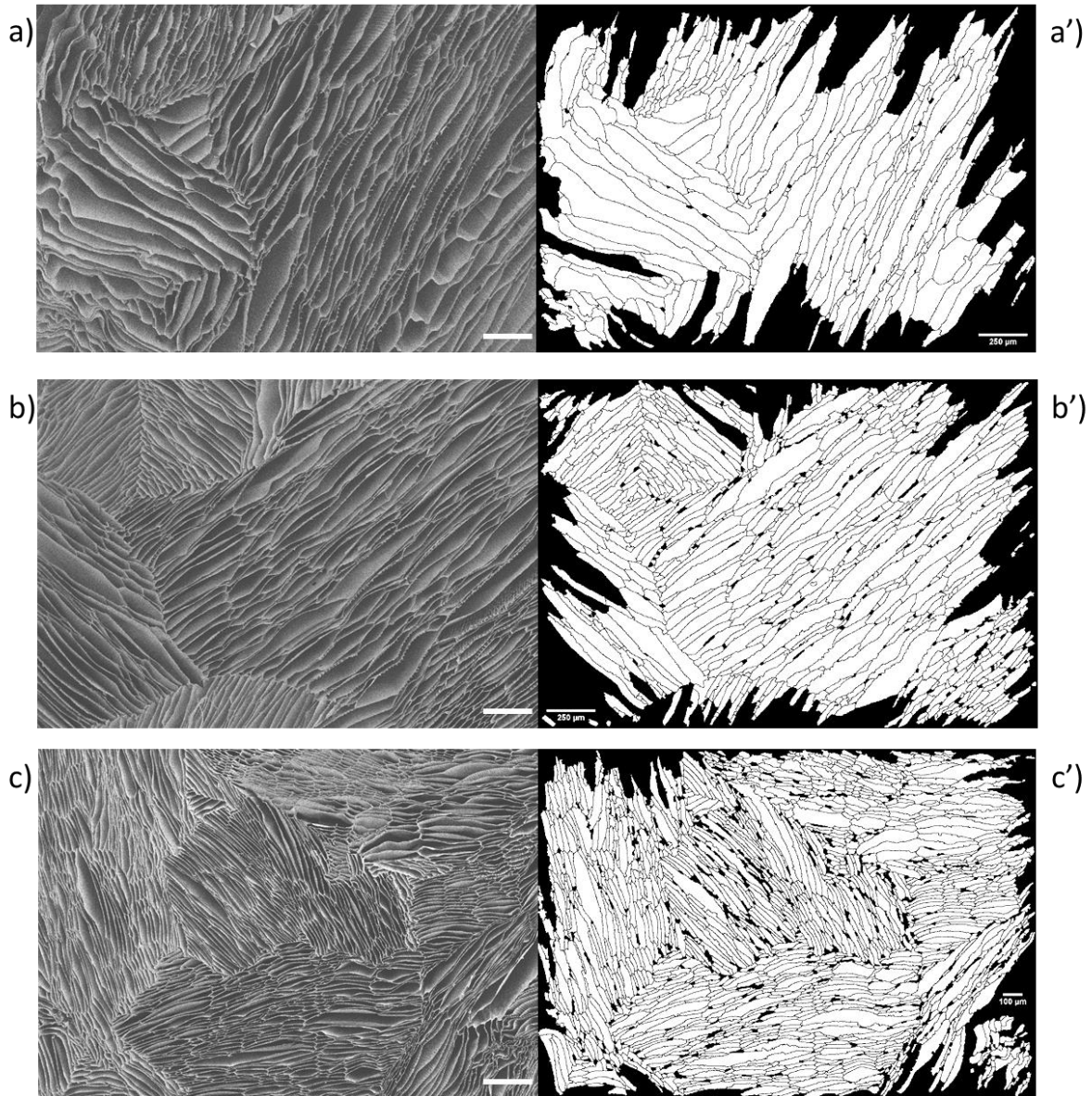
### Matériel et méthode :

2 mL d'une solution d'alginate à 4 wt%, homogénéisé sous agitation magnétique pendant une nuit, sont placées dans un tube en polystyrène en haut de la tige d'aluminium qui est plongée dans l'azote liquide.

*La congélation directionnelle est contrôlée comme décrit précédemment à l'aide des équations de Stolze, pour atteindre les vitesses de 10, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Lorsque le front de glace atteint le sommet de la solution, le tube et la solution congelée sont prélevés et stockés une nuit à  $-80^\circ\text{C}$ . Elles sont ensuite extraites de leur tube de polystyrène et lyophilisées pendant 24 heures (pression de 0,005 mbar, en présence d'un collecteur à  $-80^\circ\text{C}$ ). Elles sont découpées à la lame de rasoir de manière perpendiculaire au sens de croissance des cristaux de glace pour les analyses des tailles des pores et dans le sens de la croissance des cristaux de glace pour les mesures d'orientation. Une couche de 20 nm d'or est déposée par un métalliseur (Ref). Des clichés MEB sont pris et leur analyse est réalisée grâce au logiciel ImageJ (Fiji).*

*Le plugin « MorpholibJ » est utilisé pour délimiter les pores puis la commande « analyse particles » est utilisé pour dénombrer et mesurer les diamètres de minFerret et maxFerret des différents pores précédemment délimités (voir Figure II-4). Pour éviter de mesurer les erreurs de délimitations (qui sont dans la plupart des cas dues à une inclinaison de certaines parois), les pores d'une taille inférieure à  $150 \mu\text{m}^2$  sont ignorés ainsi que ceux en bordure d'image qui ne sont alors pas complets. Ces mesures sont effectuées sur 352 pores pour la vitesse de  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , sur 767 pores pour  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et sur 1598 pores pour la vitesse de  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (la quantité de pores analysées est définie en proportion des pores présents dans une même surface d'échantillon). Pour mesurer les orientations des pores, le plugin « OrientationJ » est utilisé.*

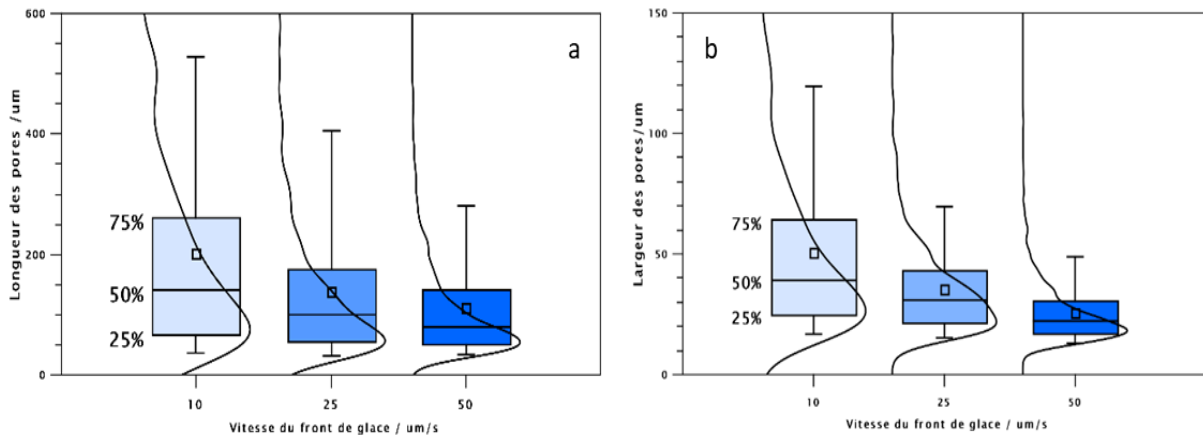




**Figure II-5:** Clichés MEB des pores obtenus à différentes vitesses de progression du front de glace après lyophilisation. Ces vues sont perpendiculaires à l'axe de croissance des cristaux de glaces. Les différentes vitesses observées sont ici  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (a),  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (b) et  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (c). Les images de droites (a', b' et c') sont les images des pores reconnus et délimités par le plugin « MorpholibJ » sur lesquelles la commande « analyse particle » a été réalisée. Échelle  $250 \mu\text{m}$  (et  $100 \mu\text{m}$  pour c').

Les clichés de la Figure II-5 présentent les variations observables entre les matrices structurés aux différentes vitesses de progression du front de glace. L'observation de ces coupes transversales (perpendiculaires au gradient thermique lors du procédé de freeze-casting) permet de visualiser les pores créés lors du retrait des cristaux de glace, qui sont en quelque sorte des négatifs. Comme rapporté dans la littérature, le rapport entre vitesse de congélation et taille des pores est ici observée : plus cette vitesse de congélation est rapide, plus les pores finalement obtenus vont être fins et nombreux, plus cette vitesse sera lente, plus les pores seront gros mais moins nombreux. Ces morphologies sont définies par la taille des cristaux de glaces qui suivent

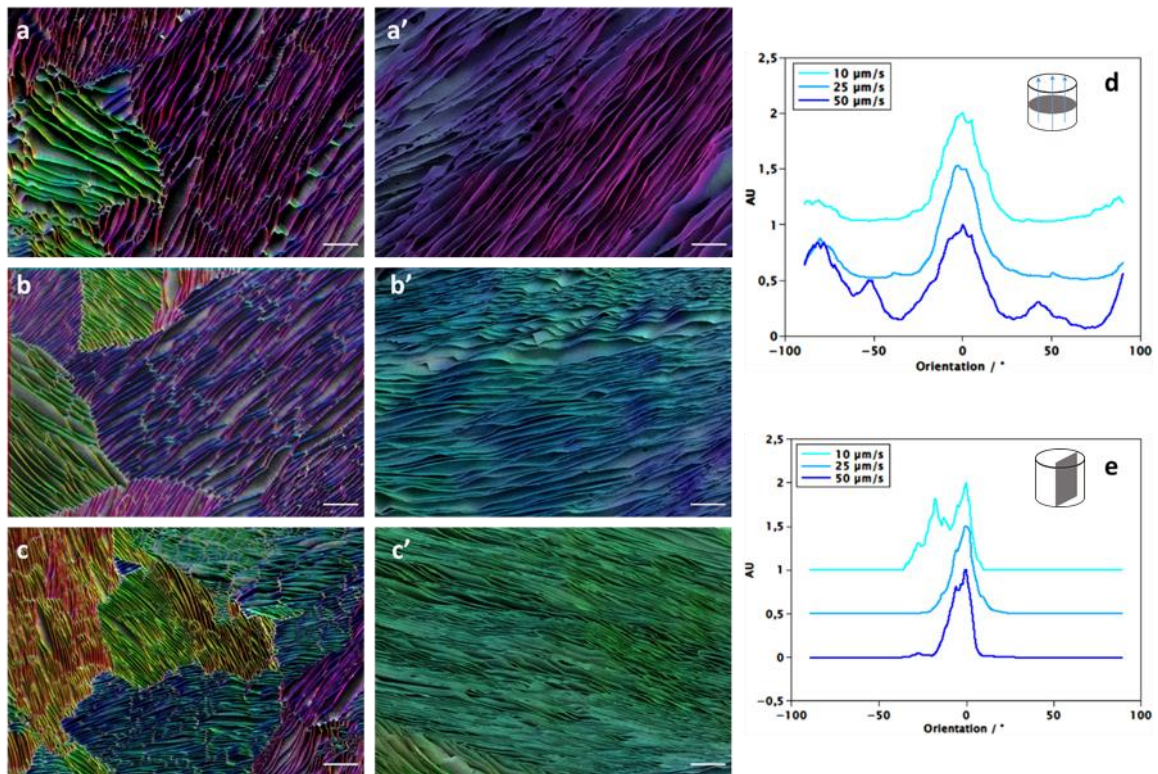
la même évolution en fonction de la vitesse du front de glace. Ces clichés MEB ont été alors utilisés pour quantifier cette différence de morphologie – par les mesures des diamètres de Feret minimaux et maximaux – et les résultats sont présentés en Figure II-6.



**Figure II-6:** Graphiques de l'évolution de la taille des pores en fonction de la vitesse du front de glace. (a) La longueur des pores caractérisé par  $\text{maxFeret}$  diminue avec la vitesse ainsi que la distribution de taille qui s'affine. (b) Il en va de même pour la largeur des pores caractérisée par  $\text{minFeret}$  (les moustaches correspondent à 5% et 95% des donnés).

Les variations de la longueur de la section des pores sont présentées dans la **Figure II-6.(a)** et leur largeur en (b). La moyenne de leur longueur diminue lorsque la vitesse augmente en passant de  $201 \mu\text{m}$  pour la vitesse de  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  à  $139 \mu\text{m}$  pour  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et à  $110 \mu\text{m}$  pour  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Il en est de même pour leur largeur qui passe de  $50 \mu\text{m}$  pour la vitesse la plus faible à  $35 \mu\text{m}$  puis à  $25 \mu\text{m}$  lorsque la vitesse de propagation du front de glace augmente. Il est aussi intéressant de noter que la variation de la dispersité diminue aussi avec l'augmentation de la vitesse, les cristaux de glace auraient alors une répartition en taille plus homogène.

Le gradient thermique appliqué (définissant la vitesse de progression du front de glace) a une incidence directe sur le nombre de cristaux et leurs dimensions. La morphologie des cristaux dépend de leur vitesse de croissance le long de l'axe imposé par le gradient thermique mais aussi de leur croissance latérale (le long d'un autre plan cristallin orienté perpendiculairement au gradient imposé)<sup>193</sup>. Ainsi plus le gradient thermique est important (plus la vitesse du front de glace l'est) et plus la croissance des cristaux dans cet axe sera dominante, résultant dans des cristaux plus fins.



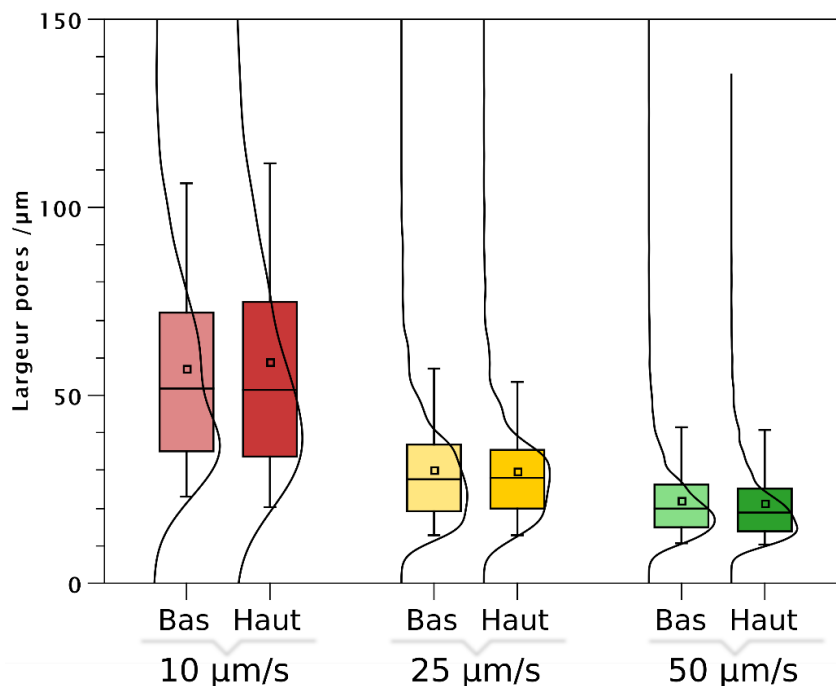
**Figure II-7:** Analyse des orientations des pores des coupes transversales (a, b et c) et longitudinales (a', b' et c') des matrices structurées à différentes vitesses :  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (a et a'),  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (b et b') et  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (c et c'). Les différentes couleurs sur les clichés représentent une orientation spécifique. Les distributions de ces orientations sont représentées dans les graphiques d (pour les coupes transversales) et e (pour les coupes longitudinales). Ces graphiques sont normalisés et centrés sur l'orientation dominante. Echelle  $250 \mu\text{m}$

Ces mêmes matrices ont été analysées à travers l'orientation de leurs pores. En utilisant le plugin OrientationJ, les pores ont été colorisés en fonction de leur orientation. Pour les coupes transversales (Figure II-7) plusieurs couleurs sont observées traduisant la présence de différentes orientations des pores. De plus les pores semblent former des domaines d'orientations regroupant une certaine quantité de pores localement. Ces domaines semblent plus petits et nombreux lorsque la vitesse du front de glace est plus élevée. Ces résultats sont retranscrits dans le graphique (d) représentant la distribution de ces alignements des pores (normalisé à l'orientation majoritaire de chaque cliché).

Pour les coupes longitudinales (a', b' et c') une couleur est très fortement présente sur chaque cliché traduisant une orientation des pores unique. Ce résultat se retrouve sur le graphe associé (e) avec l'absence de pics à différents degrés d'orientation qui traduit la prévalence d'un alignement le long de l'axe du gradient thermique imposé par le freeze-casting. Cependant pour la vitesse de  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , deux orientations proches sont observables qui traduisent une légère inclinaison des cristaux de glace d'un des domaines observés lors de leur croissance.

Ces variations du nombre de domaines et de leur taille observable dans les coupes transversales résultent de la différence de stabilité des cristaux lors du freeze-casting. En effet lorsque aucun contrôle de surface n'est appliqué à l'interface entre la solution de polymère et la tige refroidissante, une nucléation aléatoire des cristaux de glace est observée conduisant à des domaines d'orientation de macropores eux aussi aléatoire<sup>193</sup>.

La distribution homogène de l'orientation des pores dans les coupes longitudinales traduit l'importance du gradient thermique dans le contrôle de la structure des cristaux, selon lequel les pores s'alignent. La légère différence observée dans le cas de la vitesse de  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  peut s'expliquer par un gradient plus faible et donc une inclinaison de l'axe de croissance des cristaux facilité par la compétition entre la croissance le long du gradient souhaité et l'orientation du cristal. Ces analyses permettent de mettre en avant la forte anisotropie des pores le long du gradient et leur alignement, propice à la conduction des fluides<sup>160</sup>.



**Figure II-8:** Comparaison de la distance entre les murs (associé à la largeur des pores) entre le haut et le bas des matrices (coupes réalisées à environ 3 mm de chaque extrémités).

Enfin, des mesures de la largeur des pores sont réalisées sur des échantillons analogues mais cette fois les coupes sont réalisées proches des extrémités supérieures et inférieures des matrices (à environ 3 mm de la surface du haut et du bas de chaque échantillons). Ces mesures permettent d'analyser l'évolution de la taille des pores – et donc des cristaux précédemment présent – le long des échantillons.

Le graphique de la Figure II-8 montre la conservation de ces largeurs entre le haut et les bas des échantillons pour les différentes vitesses. Ainsi grâce au contrôle de la vitesse de front de glace de manière constante, la taille des cristaux est conservée le long des échantillons et valide l'utilisation des équations de Stolze *et al.* pour la structuration lors de cette thèse.

## II.3 Diagramme de composition

L'utilisation du procédé de freeze-casting permet de former des matrices poreuses structurées par les cristaux de glace à croissance contrôlée. Comme décrit précédemment, cette structuration est possible grâce au phénomène de ségrégation de phase qui rend possible la cristallisation de l'eau et la concentration des solutés dans des interstices entre ces cristaux. En effet, les espèces solubles dans l'eau ne sont pas miscibles dans la glace (à quelques rares exceptions) et sont alors ségréguées et concentrées dans les interstices lors de la congélation<sup>232</sup>, tout comme les particules<sup>192</sup> et cellules<sup>4,234</sup>. Les bactéries alors présentes dans la solution d'alginate ne font pas exception (si on les compare comme précédemment à des particules souples et déformables) et vont alors être ségréguées avec l'alginate entre les cristaux de glace. Le succès de cette encapsulation des bactéries dans les murs d'alginate dépend alors de la proportion de bactéries présentes dans les parois ainsi que de leur survie et activité.

Ainsi, lors de l'encapsulation par freeze-casting le microenvironnement autour des bactéries change. Grâce à la ségrégation de phase, les bactéries se retrouvent alors piégées entre les cristaux, dans une solution qui se concentre en alginate. L'évolution d'un tel environnement autour des cellules lors du freeze-casting a été étudié au sein du laboratoire donnant lieu à un article en co-auteur avec le docteur Kankan Qin. Cette évolution a été analysée *in situ* ainsi que par analyse calorimétrique afin de mieux comprendre l'environnement proche des cellules lors du procédé de freeze-casting.

### II.3.a Analyses thermiques

Pour comprendre le comportement des mélanges eau/alginate, des analyses DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) ont été réalisées. Cette technique permet de quantifier les flux de chaleur associés aux phénomènes de transformation thermodynamiques tels que les phénomènes de fusion, de cristallisation et d'évaporation, etc. La DSC peut alors être utile pour étudier la formation des cristaux de glace afin de mieux comprendre le devenir de l'eau au sein du matériau lors de la congélation.



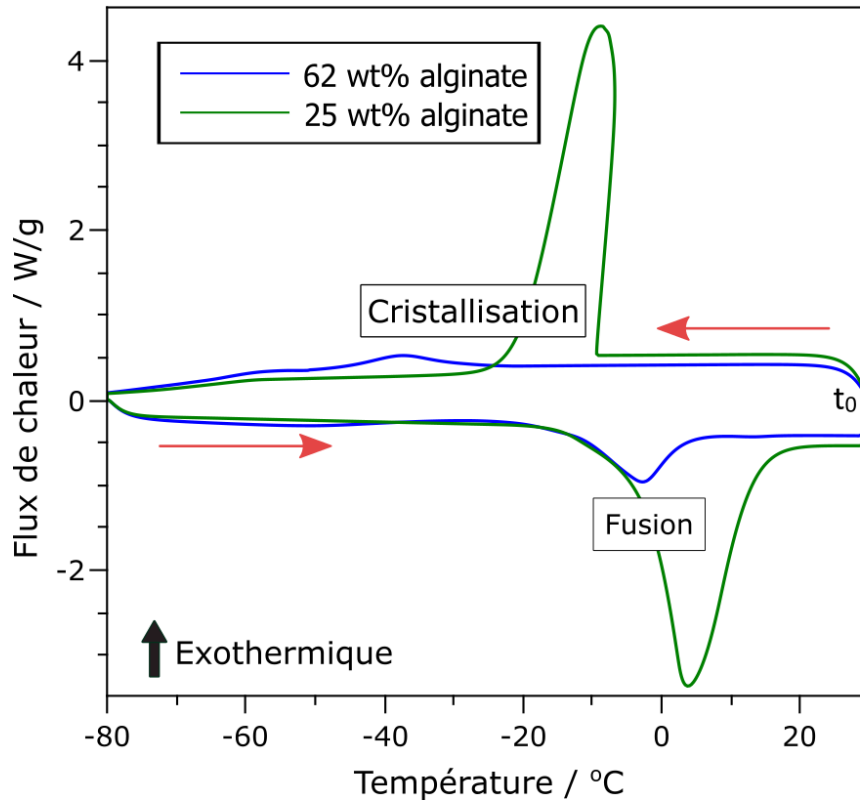
### *Matériel et méthode :*

*L'analyse calorimétrique de mélanges eau/alginate (Sigma Aldrich 9005-38-3) a été réalisée par DSC (Differential Scanning Calorimetry) afin de mettre en évidence le comportement thermique à différentes concentrations.*

*Pour cela 20mg de mélanges d'alginate de sodium et d'eau en différentes proportions, allant de 4 wt% à 90wt%, ont été placés dans des capsules d'aluminium. Ces capsules ont été scellées et laissées à homogénéiser à température ambiante pendant une semaine. Cette manipulation permet d'obtenir des mélanges le plus homogènes possible de ces deux composés, même au-delà de la limite de solubilité de l'alginate de sodium.*

*Le profil de température utilisé pendant l'analyse DSC consiste en une descente en température de 20°C à -80°C à une vitesse de -10°C/min. S'en suit une étape isothermique de 3 minutes et une remontée en température à la même vitesse jusqu'à 20°C. Ces mesures sont réalisées avec un équipement DSC TA instrument Q20 opérant en compensation de puissance sous un flux d'Azote à 50 mL.min<sup>-1</sup>. Pour s'affranchir de la surfusion, les échantillons ont été cycliquement refroidit à -80C puis une remontée en température jusqu'au milieu de l'endotherme de fusion de la glace est effectuée. Le cycle suivant s'effectue de même avec un décalage de la température de retour de 0,5°C plus froid.*

*L'analyse des données ainsi obtenues s'effectue avec le logiciel TA Universal analysis qui permet la mesure de la température de cristallisation ainsi que l'intégration du pic de fusion (endothermique, dont par convention le pic est dirigé vers les valeurs négatives). La mesure de la température de congélation aux différentes concentrations d'alginate permet d'établir une courbe de liquidus (température séparant une zone du diagramme caractérisée par l'existence d'une seule phase liquide d'une zone caractérisée par la coexistence entre une phase liquide et une phase solide). La mesure de l'endotherme de fusion de la glace permet de calculer la composition de la partie vitreuse du mélange après congélation.*



**Figure II-9:** Thermogrammes des mélanges eau/alginate à 25wt% et 62wt% d'alginate. En diminuant la température, des pics exothermiques sont observés et correspondent à la cristallisation de l'eau. L'aire sous ces pics correspond à la quantité d'eau cristallisée. Lorsque la température augmente, des pics endothermiques sont observés et traduisent la fusion de ces cristaux précédemment formés dont l'intégration quantifie la proportion de glace fondue. Ces expériences ont été menées à une vitesse de variation de température de 10°C/min.

Dans la Figure II-9, deux thermogrammes réalisés par DSC sont montrés. Les deux compositions choisies (25 et 62 wt%) permettent de mettre en évidence la dépendance des pics caractéristiques du mélange eau / alginate avec leur concentration.

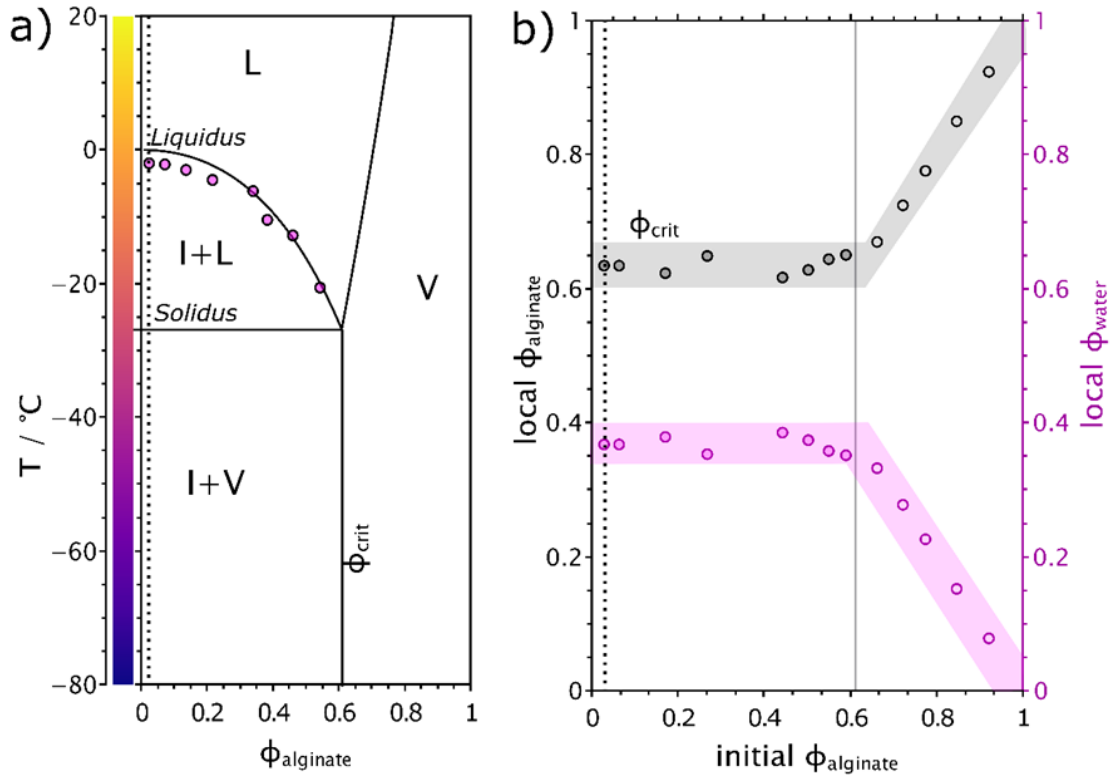
Pour la cristallisation, lorsque la concentration en polymère augmente, l'intensité du pic diminue – en fonction de la quantité de glace formée – et il se décale vers les plus basses températures. Ce décalage, nommé abaissement cryoscopique, est dû à la diminution du potentiel chimique de l'eau liquide en présence d'un soluté<sup>290</sup> – alors que le potentiel chimique de sa phase solide ne varie pas car elle cristallise pur en ségrégant les solutés. Ainsi, plus la concentration augmente et plus cette température de cristallisation diminue. Cependant un autre phénomène intervient ici : la surfusion de l'eau. Lorsque l'énergie libérée par la cristallisation de germes, appelée aussi chaleur latente de cristallisation, est inférieure à la barrière énergétique associée, chaque germe formé fond (sans avoir atteint la taille critique requise à l'initiation de la cristallisation). L'eau peut alors continuer de refroidir sans cristalliser. Cependant, lorsque la

crystallisation commence elle est rapide et libère de l'énergie, la chaleur latente de cristallisation<sup>291</sup>. Ainsi la quantité d'eau cristallisant à ce moment peut être suffisante pour contrebalancer le flux de chaleur contrôlé par DSC. C'est pourquoi un léger retour en arrière est observé pour la courbe verte à 25wt% d'alginate dans la Figure II-9. L'analyse de ce pic est alors imprécise, il existe cependant des méthodes pour régler ce problème. En faisant des cycles de cristallisation et de fusion avec un décalage de la température de retour (à laquelle on choisit de redescendre en température) on peut s'affranchir de la surfusion. Cette méthode est alors appliquée pour mesurer la température de cristallisation du mélange.

Lors de la fonte des cristaux de glace, lorsque la concentration en polymère augmente, la seule différence observée est l'intensité du pic endotherme. En effet, l'aire sous les pics endothermiques de fusion de la glace correspond à l'énergie nécessaire à la fonte de la glace formée au moment de la congélation. Cependant lorsqu'elles sont comparées à la masse d'eau du système, une différence est observée. La quantité d'eau ayant cristallisé est inférieure à celle introduite. Ainsi la proportion d'eau n'ayant pas cristallisé est sous forme vitreuse<sup>290</sup> et n'est pas observable directement par DSC. En comparant alors ces deux proportions, d'eau initialement dans le mélange et d'eau ayant cristallisé, on peut remonter indirectement à la proportion d'eau n'ayant pas cristallisé. Cette proportion d'eau vitreuse se retrouve alors dans la partie ségréguée, avec le polymère auquel elle est liée, dans une zone emprisonnée entre les cristaux de glace. Ces proportions peuvent alors être calculées et sont représentées en (c) de la Figure II-10.

En présence de solutés (dont les polymères), l'eau peut être séparée en plusieurs groupes possédant différentes sphères d'hydratation. Ces sphères d'hydratation décrivent l'interaction des molécules d'eau avec le soluté<sup>290,292</sup>. L'eau libre aussi nommée *freezing water* ou *bulk* sont les molécules d'eau qui ont un potentiel chimique non modifié par les chaînes polymères et qui peuvent alors congeler. L'eau liée aussi appelée *non-freezing water* compose la première sphère d'hydratation. Les molécules d'eau de ce groupe ont un potentiel chimique suffisamment abaissé par les chaînes polymères pour que leur réseau de liaison hydrogène soit déformé de manière critique. Ainsi, lors de la descente en température, tandis que les molécules du *bulk* cristallisent, celles de la première sphère d'hydratation se trouvent associées aux chaînes polymères, sous forme vitrifiée.





**Figure II-10 :** (a) Diagramme de composition du mélange eau/alginate. Les points magentas ont été mesurés par DSC à une vitesse de descente en température de  $-10^\circ\text{C}/\text{min}$  et décrivent le phénomène d'abaissement cryoscopique en fonction de la fraction volumique initiale d'alginate. La courbe du liquidus est définie théoriquement par l'Équation II-2 et la courbe théorique de la température de transition vitreuse est, elle, calculée d'après le modèle de Gordon-Taylor décrit en Équation II-3. (b) Composition de la phase ségrégée en fonction de la concentration initiale d'alginate après congélation. La proportion d'eau liée (non-freezing water) représentée en magenta, est calculée d'après la différence de la quantité d'eau mesurée avec l'enthalpie de fusion de la glace et la quantité d'eau initiale. La proportion d'alginate dans cette même phase est représentée en noir.

Le diagramme de composition de la Figure II-10 a ainsi pu être établi en analysant les thermogrammes effectués, allant des fractions volumiques initiales  $\phi_{\text{alginate}}$  de 0,025 à 0,65. Par la mesure de la température à laquelle la cristallisation commence (la température *onset*) la courbe du *liquidus* peut être retrouvée. Pour calculer théoriquement la courbe du *liquidus* nous avons utilisé la combinaison de l'extension de l'équation de Schröder avec le model de Flory proposé par les travaux de V. Kocherbitov<sup>290</sup>. L'Équation II-2 nous permet alors de tracer les températures de cristallisation pour des polymères à haut degrés de polymérisation ( $N \gg 1$ ).

Équation II-2

$$T_f = \frac{1 + \frac{W}{\Delta H} \phi_p^2}{\frac{1}{T^0} - \frac{R}{\Delta H} (\ln(1 - \phi_p) + \phi_p)}$$

Dans cette équation,  $w$  est le paramètre d'interaction de la solution ( $\text{J.mol}^{-1}$ ),  $\Delta H$  est l'enthalpie de fusion de la glace ( $\Delta H = 6007 \text{ J.mol}^{-1}$ ),  $\phi_p$  est la fraction volumique du polymère, ici l'alginate et  $R$  est la constante des gaz parfait (en  $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ).

Cependant aucune cristallisation n'est observée lorsque la concentration initiale dépasse une fraction volumique de  $\phi_p=0,54$  d'alginate (dans les limites de détection de la DSC utilisée). Ainsi, à cette vitesse de refroidissement, l'eau présente dans le système ne cristallise plus au-delà de cette concentration et se trouve sous forme vitreuse. Ces résultats sont par ailleurs en concordance avec les équations de Godon-Taylor qui ont été ici utilisées pour compléter ce diagramme de composition par la représentation théorique de la courbe de la transition vitreuse ( $T_g$ ).

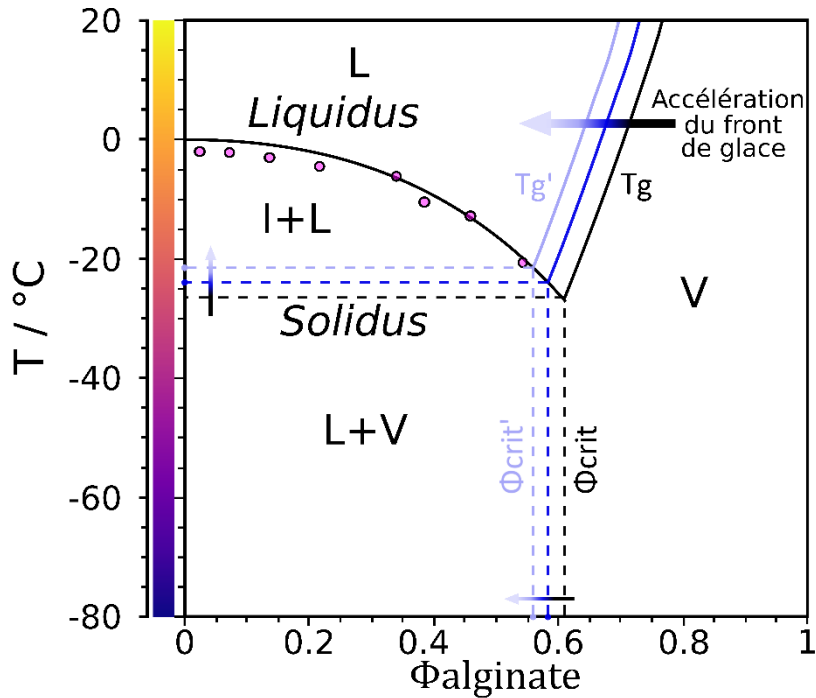
$$T_g = \frac{T_{gw}\phi_w + kT_{gp}\phi_p}{\phi_w + k\phi_p}$$

### Équation II-3

Où  $T_g$  correspond à la température de transition vitreuse à une composition donnée,  $T_{gw} = -137,15^\circ\text{C}$  est la température de transition vitreuse de l'eau,  $T_{gp} = 120^\circ\text{C}$  celle du polymère et  $k$  un facteur empirique fixé à 0,5 d'après les travaux de Kocherbitov<sup>290</sup> sur d'autres systèmes polysaccharides.

Cette courbe de  $T_g$  croise la courbe du *liquidus* vers une température de  $-27^\circ\text{C}$  et a une fraction volumique de  $\phi_{\text{crit}}=0,6$ . Ainsi, pour une concentration initiale d'alginate inférieure à  $\phi_{\text{crit}}$ , lorsque la température passe sous la ligne du *liquidus*, la solution va se séparer entre de la glace pure et une solution alors plus concentrée. Le mélange continue de se concentrer en alginate jusqu'à atteindre la température de la ligne du *solidus* (définie par la température d'intersection du *liquidus* et de la  $T_g$ ). La solution concentrée ne peut alors plus être déshydratée et se vitrifie. Il y a coexistence entre la glace et la solution vitrifiée. La concentration cette solution vitreuse est fixée à  $\phi_{\text{crit}}$  et n'évolue plus si la température diminue.

En utilisant l'intégration des pics de fusions comme mentionné précédemment, la composition de la phase vitreuse a pu être déterminée. Ainsi d'après la Figure II-10 (c), pour toute concentration initiale en alginate inférieure à  $\phi_{\text{crit}}$  la phase vitreuse est composée de  $\phi_{\text{crit}}$  d'alginate et de  $1-\phi_{\text{crit}}$  d'eau vitreuse. Cependant lorsque la concentration initiale en polymère est supérieure à  $\phi_{\text{crit}}$  il n'y a pas de cristallisation et le système se vitrifie entièrement à cette concentration initiale



**Figure II-11:** Schéma de l'impact de la vitesse sur le diagramme de composition eau/alginate.

Contrairement à la courbe du *liquidus* fixée par les lois de la thermodynamique, la  $T_g$  est un phénomène éminemment cinétique. Alors que le *liquidus* est invariant pour une composition donnée, la courbe de la  $T_g$  est fortement dépendante de la vitesse des variations de températures<sup>293,294</sup>. Une vitesse de descente en température plus élevée induit alors une augmentation de la température de transition vitreuse du mélange. Ainsi nous pouvons formuler l'hypothèse suivante : le point d'intersection du *liquidus* et de la  $T_g$  se trouve modifié lorsque la vitesse de congélation varie, impactant alors la composition de la solution vitreuse finale :  $\Phi_{crit}$ . Et de manière plus spécifique, lorsque la vitesse de progression du front de glace augmente, la  $T_g$  augmente aussi, déplaçant le point d'intersection des deux courbes, faisant évoluer la  $\Phi_{crit}$  vers des compositions moins concentrées en alginate.

Grâce à ces analyses thermiques, nous avons pu déterminer qu'une évolution de la composition a lieu dans les interstices des cristaux formés lors de la congélation. Ainsi les fractions volumiques entre les cristaux de glace sont fixées indépendamment des proportions initiales par l'intersection des courbes du *liquidus* et de la  $T_g$ , et pour un mélange eau/alginate elle est fixée à  $\Phi_{crit} = 0,6$  – pour une vitesse d'analyse de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Afin de compléter les analyses thermiques, l'analyse spatiale d'un tel phénomène lors de la congélation directionnelle a été réalisé.

### II.3.b Analyse spatiale de la croissance des cristaux

L'analyse spatiale a pour but de mieux comprendre l'évolution du microenvironnement autour des bactéries que nous allons encapsuler. En effet, contrairement à la DSC où chaque phénomène ayant lieu dans les capsules sont analysés simultanément, une résolution spatiale de ces phénomènes permettrait une analyse plus spécifique de l'environnement proche des cellules. Ainsi, en collaboration avec Sylvain Deville, Directeur de recherche CNRS à l'Institut Lumière Matière (Lyon, France), des observations *in situ* par microscopie confocale ont été réalisées.

Le montage représenté en Figure II-12 (a) permet d'observer le front de glace lors de la congélation directionnelle. Il est composé de deux Peltiers – un chaud et un froid – afin d'appliquer un gradient thermique contrôlé, une solution de polymère mélangé à un fluorophore est emprisonnée entre deux lamelles de verre formant une cellule Hele-Shaw et déplacé du Peltier chaud vers le Peltier froid. L'objectif du microscope confocale est placé au-dessus du gradient à la température de formation des cristaux – au front de glace.

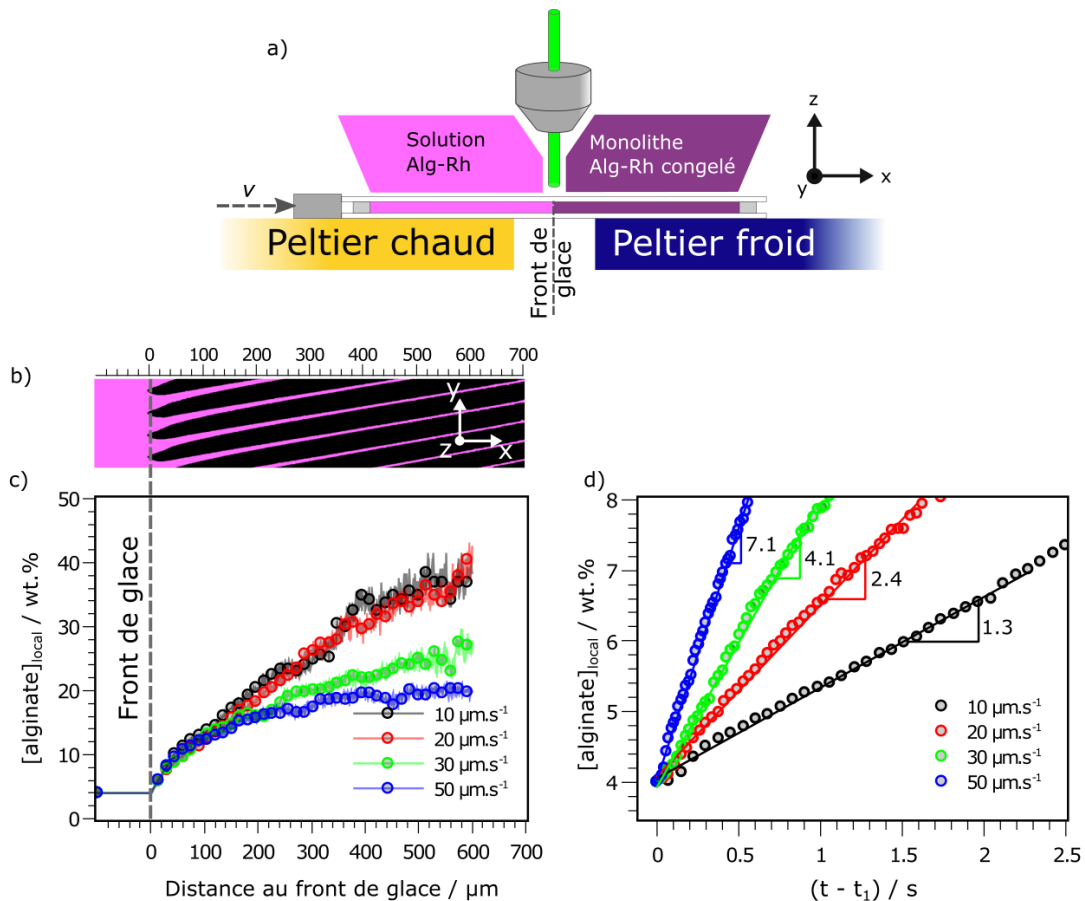
#### *Matériel et méthode :*

*Le système de congélation directionnelle couplée au microscope confocale, utilisé pour observer in situ la croissance de la glace et la ségrégation de phase, est composé de deux Peltiers indépendants contrôlés par un module ainsi que d'un contrôle de déplacement de l'échantillon en XY.*

*Les deux Peltiers sont séparés de 2 mm. Les observations ont été réalisés à travers un microscope confocal Laser Scanning Platform Leica TCS SP8 (Leica Microsystems SAS, Allemagne).*

*Une solution d'alginate à 4 wt% est utilisé avec de rhodamine B (0,1mM). Cette solution fluorescente est alors placée entre deux lamelles de verre (chambre Hele-Shaw) et déplacé depuis le Peltier chaud (12°C) vers le Peltier froid (-8°C) à différentes vitesses linéaires, à 10, 20, 30 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . La distance entre les deux Peltiers est fixée ici à 2 mm.*

*L'objectif du microscope confocale est placé au-dessus du gradient thermique, au niveau du front de glace. Les clichés de croissance de la glace et de ségrégation de phases sont analysés par le logiciel Fiji.*



**Figure II-12:** Évaluation spatiale de la composition des interstices entre les cristaux de glace pour différentes vitesses de front de glace. (a) L'observation de la croissance de la glace *in situ* est réalisée en utilisant un microscope confocale, couplé avec un montage de congélation directionnelle modifié. Les deux Peltiers établissent un gradient thermique contrôlé. L'objectif du microscope confocale est placé au-dessus de la température de cristallisation, et permet l'observation du front de glace. (b) Cliché de la congélation directionnelle de la solution d'alginate fonctionnalisée par de la rhodamine-B. Les interstices formés entre les cristaux de glace, riches en alginate, sont visibles en magenta, et en noir les zones occupées par la glace. (c) La concentration en alginate des interstices peut être obtenue en intégrant le volume des cristaux de glace et augmente avec la distance au front de glace (avec comme hypothèse une solubilité nulle des solutés dans la glace). (d) Grâce à la vitesse de la congélation, l'évolution de la concentration d'alginate dans les interstices peut être retrouvée. La concentration de l'alginate au contact avec le front de glace est ici présentée.

Afin de mesurer l'impact de la vitesse de croissance des cristaux de glace sur la ségrégation de phase qui a lieu dans notre système eau/alginate pendant la congélation directionnelle, une solution d'alginate à 4 wt% marquée avec de la rhodamine B a été utilisée. Cette solution permet d'obtenir des clichés 2D ainsi que 3D de la congélation directionnelle grâce au microscope confocale utilisé en couplage avec des Peltiers à températures contrôlées. Par le déplacement de l'échantillon à différentes vitesses : 10, 20, 30 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , les différents fronts de glace générés sont observés – représentés en Figure II-12(b) – avec en magenta, la solution d'alginate et de rhodamine, et en noir les cristaux de glace. Dix clichés consécutifs sont analysés pour

chaque vitesse. L'analyse de ces clichés se fait par l'intégration de l'aire occupée par les cristaux, en noir, en fonction de leur distance au front de glace. La conversion de ces données de  $\phi_{\text{glace}}$  à  $\phi_{\text{alginate}}$  permet de mettre en évidence des évolutions de composition locale en fonction de la vitesse de congélation. La Figure II-12 (c) présente ainsi l'évolution de la concentration en alginate dans les interstices, entre les cristaux de glace, en fonction de leur distance au front de congélation et de leur vitesse. L'évolution de la concentration d'alginate peut être aussi représentée en fonction du temps, en Figure II-12 (c), mettant en lumière l'aspect cinétique des changements de concentration d'alginate dans les interstices formés entre les cristaux de glace.

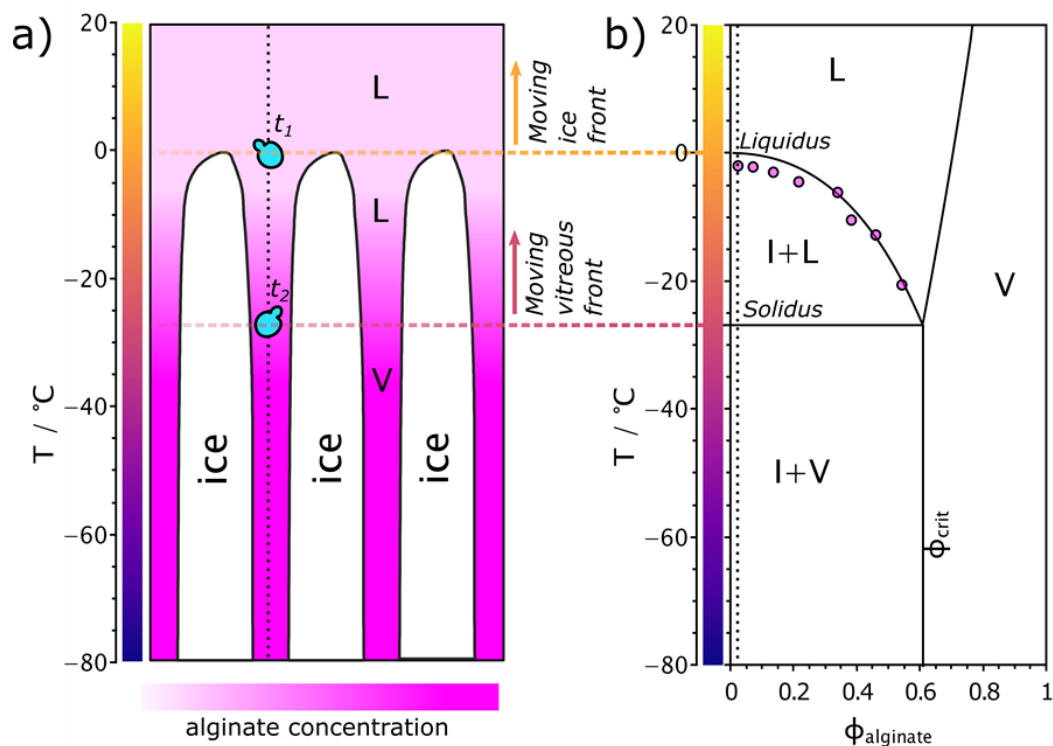
Le graphe (c) met en évidence la proximité de l'évolution de la composition des interstices pour les vitesses de 10 et 20  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  évoluant linéairement jusqu'à 40wt% d'alginate à une distance au front de congélation de 600  $\mu\text{m}$ . Pour la vitesse de 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , la zone entre les cristaux de glace est moins concentrée en alginate pour une même distance avec une concentration se stabilisant vers les 20wt%. Pour la vitesse intermédiaire de 30  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , la concentration finale d'alginate dans les interstices atteint les 26wt% à 600  $\mu\text{m}$ . Ces données mettent clairement en avant l'importance de la vitesse du front de glace sur la composition des zones interstitielles durant la congélation directionnelle.

Les différences de profils observées pour les différentes vitesses peuvent être expliquées par la température de  $-8^{\circ}\text{C}$  fixée pour le Peltier froid. La transition vitreuse étant un phénomène éminemment cinétique, sa température caractéristique dépend de la vitesse de la transformation. Ainsi pour des vitesses de front de glace relativement élevée (telles que 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , dans notre expérience), la  $T_g$  devrait se décaler vers des températures plus hautes, décalant alors son intersection avec la courbe de *liquidus* à des températures plus hautes ( possiblement proches de  $-8^{\circ}\text{C}$ ). Ainsi  $\phi_{\text{crit}}$  peut être atteinte et la composition est fixée à 20wt% ce qui se traduit ainsi par un plateau. Pour des vitesses plus faibles, le croisement entre la  $T_g$  et le *liquidus* se fait à des températures plus basses ne permettant alors pas d'atteindre  $\phi_{\text{crit}}$  au cours de cette expérience, la courbe d'évolution de la concentration observée n'atteint alors pas de plateau et pourrait continuer à se concentrer si la température du Peltier était plus basse. Le fait de représenter l'évolution de la zone interstitielle en fonction du temps permet d'obtenir sa vitesse de concentration – les pentes des courbes représentées en (d) sont maximales à proximité du front de glace puis diminuent. Ainsi l'échelle utilisée permet de visualiser les pentes critiques des concentrations.

Cette représentation met en évidence l'impact de la cinétique, en particulier de la vitesse du front de glace, sur l'évolution de la concentration entre ces cristaux. Pour des vitesses plus

faibles, l'évolution de la concentration est plus lente mais la concentration finale est plus importante. Pour des vitesses de front de glace élevées, la concentration entre les cristaux de glace augmente plus rapidement mais atteint sa limite à une valeur plus faible.

Dans le cadre de cette thèse, ces expériences d'analyses spatiales (en liens avec les analyses thermiques pour le diagramme de composition) permettent de se rapprocher des changements subvenant lors de la congélation directionnelle, au voisinage local des bactéries encapsulées. En effet, ces analyses locales permettent de faire une ébauche de la composition finale autour des bactéries – proportion d'alginate vitreux et d'eau vitreuse – ainsi que les cinétiques de variation de la concentration qui peuvent toutes deux avoir un impact sur la survie des bactéries encapsulées. Ainsi la Figure II-12 (d) permet de sonder les vitesses et amplitudes des variations de compositions qui ont lieu dans le microenvironnement proche des bactéries.



**Figure II-13:** (a) Schéma de la croissance de la glace lors du procédé de freeze-casting avec, en cyan des cellules lors de leur encapsulation, en magenta, la concentration d'alginate qui augmente avec l'intensité, et en blanc les cristaux de glace. Ce schéma est relié au diagramme de composition pour une compréhension plus claire des différentes étapes par lesquelles passent les cellules lors du procédé de freeze-casting. En  $t_1$ , les cellules entrent en contact avec le front de glace et se retrouvent dirigées vers les interstices. Puis entre  $t_1$  et  $t_2$  la ségrégation de phase déshydrate le milieu interstitiel, concentrant ainsi la suspension jusqu'à atteindre la composition de  $\phi_{\text{crit}}$ . En  $t_2$ , la ségrégation s'arrête car la composition est de  $\phi_{\text{crit}}$  et le milieu interstitiel se vitrifie.

Pour comprendre l'évolution du microenvironnement autour des cellules, le schéma (a) de la Figure II-13 représente schématiquement les différentes étapes par lesquelles passent ces cellules lors du procédé de freeze-casting. Au temps  $t_1$ , les cellules rentrent en contact avec le front de glace (qui est alors à la température critique de la congélation) et entrent dans les interstices entre ces cristaux. Entre  $t_1$  et  $t_2$ , les cellules se trouvent dans les interstices où la solution est de plus en plus concentrée en alginate et en cellules. La suspension entre les cristaux de glace se déshydrate, au profit du grossissement des cristaux, jusqu'à atteindre la composition  $\phi_{crit}$ . En  $t_2$ , les cellules se retrouvent piégées dans une phase vitreuse où la cristallisation et la ségrégation associées s'arrêtent, fixant ainsi la concentration et le microenvironnement des cellules. Ce schéma est relié au diagramme de composition présenté en (b).

Lors de l'encapsulation des bactéries par freeze-casting (jusqu'à  $-80^\circ\text{C}$ ), la concentration en alginate est de 4 wt% (correspondant à  $\phi=0,025$ , donc inférieure à  $\phi_{crit}$ ) et la vitesse de progression du front de glace est constant. Il est donc possible d'utiliser ce diagramme de composition pour décrire l'évolution du microenvironnement des bactéries. Ainsi, le microenvironnement des cellules évolue lors du freeze-casting et devient plus concentré en alginate, suivant la ligne de *liquidus* jusqu'à atteindre la fraction volumique de  $\phi_{crit}$  où il se solidifie à l'état vitreux, arrêtant ainsi l'augmentation de sa concentration. Il est possible ici d'établir de manière analogue au front de glace, une nouvelle limite spatiale appelée front vitreux qui définirait la limite entre la ségrégation de phase et la zone vitreuse où  $\phi_{crit}$  est atteinte.

Il est toutefois important de rappeler que les conditions de congélation directionnelles réalisées dans cette coopération sont différentes de celles réalisées au sein du laboratoire. Le montage est en effet différent avec dans un cas la congélation à travers un montage 2D où les températures des deux extrémités sont contrôlées, et dans l'autre un montage 3D avec un seul contrôle de température. Cependant les résultats obtenus ici sont riches en information et permettent de mieux aborder l'évolution des concentrations entre les cristaux lors du freeze-casting.

Comme nous l'avons vu précédemment, la vitesse du front de glace a un fort impact sur la morphologie des pores, mais aussi sur la composition lors du procédé. Ce paramètre va donc définir la composition de l'environnement proche des bactéries (par  $\phi_{crit}$ ) ainsi que la vitesse de modification de ce microenvironnement. La vitesse de progression du front de glace peut donc prendre un rôle prépondérant pour déterminer la survie bactérienne lors de l'encapsulation par freeze casting.



## II.4 La congélation directionnelle comme outil pour l'encapsulation de bactéries

Comme vu précédemment, le procédé de freeze-casting est un bon candidat pour l'encapsulation de bactéries. Par le contrôle de la croissance de la glace, une structure poreuse et anisotrope est obtenue, composée d'une multitude de parois. Des études menées sur des particules de céramiques<sup>192</sup> et sur des levures<sup>4,103</sup> (avec la compréhension des interactions entre les particules et le front de glace : sédimentation, rejet et piégeage), suggèrent que l'encapsulation de bactéries par congélation directionnelle est envisageable. Cette encapsulation serait principalement dépendante de deux phénomènes : une répulsion – dépendante des énergies d'interactions de Van der Waals aux interfaces solide-liquide – et d'une attraction vers le front de glace – dépendant des forces de frottement due à la viscosité de la solution<sup>179,192</sup>. Grâce à ces paramètres, des vitesses critiques des fronts de glace peuvent être trouvées pour les régimes de sédimentation, de rejet et de piégeage. L'ajustement des vitesses de progression du front de glace peut alors s'optimiser afin d'assurer l'encapsulation des bactéries en suspensions.

Historiquement, dans la littérature, la viabilité des cellules lors d'une congélation a été associée à la vitesse de refroidissement (que l'on peut associer à la vitesse du front de glace dans le cas de la congélation directionnelle)<sup>189,295</sup>. En effet, l'hypothèse des deux facteurs lors de la congélation a été mise en évidence par Mazur *et al.* en 1972<sup>238</sup> et traduit les principaux paramètres pour optimiser la survie des cellules congelées (voir I.3.iii.a) – la survie des cellules congelées serait principalement dépendante de la vitesse et amplitudes de leur déshydratation ainsi que de la formation de glace intra-cellulaire. Ainsi, si la vitesse de congélation est trop lente, les cellules se déshydratent de manière critique et la concentration en sel dans ces cellules devient cytotoxique. Inversement, si la vitesse est trop grande, la formation de glace intracellulaire est observée (la déshydratation n'ayant pas lieu, la surfusion induite par ces sels ne suffisent plus à empêcher la cristallisation) menant aussi à la mort de la cellule. Il existe donc un optimum de vitesse de congélation qui permet une déshydratation partielle et une minimisation de la croissance des cristaux intra-cellulaire. Cependant cette vitesse optimale dépend de la nature des membranes et parois ainsi que de la composition interne des cellules et est ainsi spécifique à chaque espèce. Il est donc important de pouvoir contrôler cette vitesse de descente en température et de congélation tant pour la capacité d'encapsulation que pour la

survie des bactéries. Leur survie est aussi étudiée en faisant varier différents paramètres clés tels que la concentration initiale et la vitesse du front de glace.

#### II.4.a Encapsulation

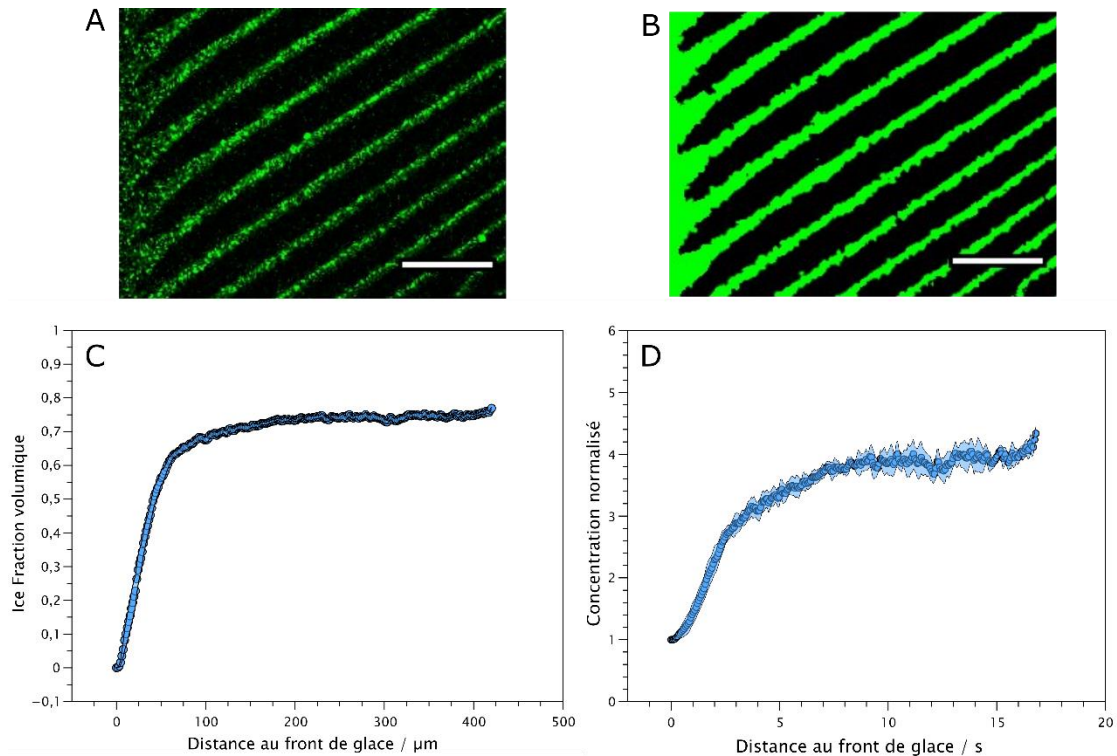
Le travail réalisé en collaboration avec Sylvain Deville sur la congélation directionnelle *in situ* sous microscope confocale présenté précédemment, a été reproduit cette fois lors de la congélation d'une suspension de bactéries, afin d'observer en temps réel l'encapsulation des *Pseudomonas putida*. Une suspension de bactéries (d'une concentration initiale comprise entre  $10^8$  et  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) a été ajoutée à une solution d'alginate à 4 wt%. Un test live/dead (SYTO9/Propidium Iodide) a été utilisé afin de pouvoir observer au microscope confocal les bactéries lors de la congélation directionnelle. Ces expériences ont été réalisées à une vitesse de 25  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et sont présentés en Figure II-14.

##### *Matériel et méthode : Microscopie confocale de l'encapsulation de bactéries*

*Le système de congélation directionnelle couplée au microscope confocale, utilisé pour observer in situ l'encapsulation des Pseudomonas putida, est composé de deux Peltiers indépendants contrôlés par le même élément ainsi que d'un contrôle de déplacement de l'échantillon en XY. Les deux Peltiers sont séparés de 2 mm. Les observations ont été réalisées à travers un microscope confocal Laser Scanning Plateform Leica TCS SP8 (Leica Microsystems SAS, Allemagne).*

*Une préculture de Pseudomonas putida mt2 (commandées chez DSMZ, Allemagne ref : DSM 3931) est réalisée en mélangeant 100  $\mu\text{L}$  d'aliquote de stockage à 14,9 mL de LB Broth et mis à incuber une nuit (30°C sous agitation). Puis une culture est réalisée en prélevant 1,2 mL de la préculture que l'on ajoute à 58,8 mL de LB Broth. Cette culture est ensuite mise à incuber pour 24 heures, puis séparée dans deux tubes de 30 mL et centrifugée à 3046 G pendant 10 min. Les culots obtenus sont redispersés dans 30 mL d'une solution d'alginate à 4 wt%. Ces suspensions sont marquées par fluorescence avec un test Live/Dead (REF SYTO:9/Iodure de Propidium) mettant en évidence les bactéries vivantes et mortes. Elles sont ensuite placées entre deux lamelles de verre (cellules Hele- cells) séparées d'une épaisseur de 100  $\mu\text{m}$ . Ces échantillons sont déplacés depuis le Peltier chaud (12°C) vers le Peltier froid (-10°C) à une vitesse linéaire de 25  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .*

L'objectif du confocale est placé au-dessus du gradient thermique créé par les deux Peltiers, au niveau du front de glace. Le montage est similaire à celui représenté en Figure II-12. Les clichés de croissance de la glace et de l'encapsulation des bactéries par la ségrégation de phases sont analysés en utilisant le logiciel Fiji (Threshold).



**Figure II-14:** Évaluation spatiale de la ségrégation de phase induite par le procédé de congélation directionnelle à  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  d'une suspension de bactérie dans l'alginate. (A) Cliché de la congélation directionnelle de la suspension de *Pseudomonas putida* marquées par du SYTO9 (en vert). Les cristaux de glaces ne sont pas marqués et apparaissent en noir. Seules les bactéries sont fluorescentes, l'alginate n'est pas visible. (B) Traitement du cliché précédent par le logiciel Fiji. (C) L'intégration des cristaux de glaces obtenue en B nous permet de remonter à l'évolution de la fraction volumique de la glace en fonction de la distance au front de congélation. (D) Représentation graphique de l'évolution de la concentration de la suspension dans les interstices en fonction du temps après le contact avec le front de glace. Ici la concentration est normalisée à 1 correspondant à la concentration en bactérie et alginate avant la ségrégation. Échelle (A) et (B):  $100 \mu\text{m}$ , concentration initiale : alginate 4 wt%, bactéries :  $10^8$ - $10^9 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

L'image (A) de la Figure II-14 est un cliché de microscopie confocale de la progression des cristaux où la ségrégation de phase est observable. Le gradient thermique est appliqué horizontalement avec le côté froid à droite, le front de glace est visible sur la gauche du cliché. Les bactéries représentées en vert (marqués par l'iodure de propidium) et par contraste, les zones noires correspondent aux cristaux de glace. Ainsi de nombreux cristaux alignés et bien définis sont visibles et un front de glace linéaire est obtenue, de plus l'augmentation de la

concentration de la suspension dans les interstices est observable. Cependant, l'hétérogénéité de la suspension peut être soulignée qui – contrairement à l'alginate fonctionnalisé utilisé dans la précédente étude formant une solution homogène (Figure II-12) – engendre une difficulté d'analyse pour le calcul de la fraction volumique de la glace ( $\phi_{\text{glace}}$ ). Ainsi après un traitement par le logiciel Fiji, l'image (B) est obtenue. Grâce aux différentes étapes de traitements (Threshold, gaussian, movie stabilization), la suspension dans les interstices a été lissée pour permettre la délimitation des cristaux de glace et leur intégration.

La fraction volumique de la glace peut être ainsi mesurée et est représentée en (C) en fonction de la distance au front de glace. La courbe obtenue présente une progression similaire à celles observées dans les expériences précédentes.

La conversion de ces données de  $\phi_{\text{glace}}$  à  $\phi_{\text{suspension}}$  (fraction volumique de la suspension de bactéries et alginate, respectivement) permet de mettre en évidence l'évolution de la concentration du mélange dans les interstices en fonction du temps, après le contact avec le front de glace. Ainsi le graphique (D) représente l'évolution de la concentration de la suspension entre les cristaux, normalisée à la concentration initiale de la solution avant ségrégation. Les calculs étant effectués à partir de l'intégration des cristaux de glace ( $\phi_{\text{glace}}$ ), l'évolution de la concentration du mélange ne permet pas de différencier les bactéries et de l'alginate, mais reste pertinente.

D'après ces expériences, la concentration du mélange est multipliée par 4 entre les cristaux et atteint un plateau – ce qui correspondrait à une concentration d'environ 16wt% pour l'alginate et de  $4 \times 10^8$  -  $4 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> pour les bactéries. La mesure de la pente initiale en fonction du temps permet de calculer la vitesse de l'augmentation de la concentration dans les premiers instants, qui serait d'environ 3,35 wt%.s<sup>-1</sup> pour l'alginate – la concentration est multipliée par 1,8 chaque seconde après être entrée en contact avec le front de glace. Cette expérience permet d'établir une approximation de la modification de l'environnement des bactéries lors de la congélation directionnelle.

Il faut cependant être vigilant si l'on veut comparer ces résultats aux expériences précédemment réalisées où seul de l'alginate était congelé. En effet dans ces nouvelles manipulations la présence de bactéries modifie légèrement la concentration initiale – pour une concentration de  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> la variation de masse est aux alentours de 0,028wt% du (mélange calcul en annexe) – mais surtout, l'ajout de particules modifie les interactions à

l'interface avec les cristaux ainsi que la viscosité. Ces deux paramètres jouent un rôle clef dans la structure des cristaux<sup>193</sup>.

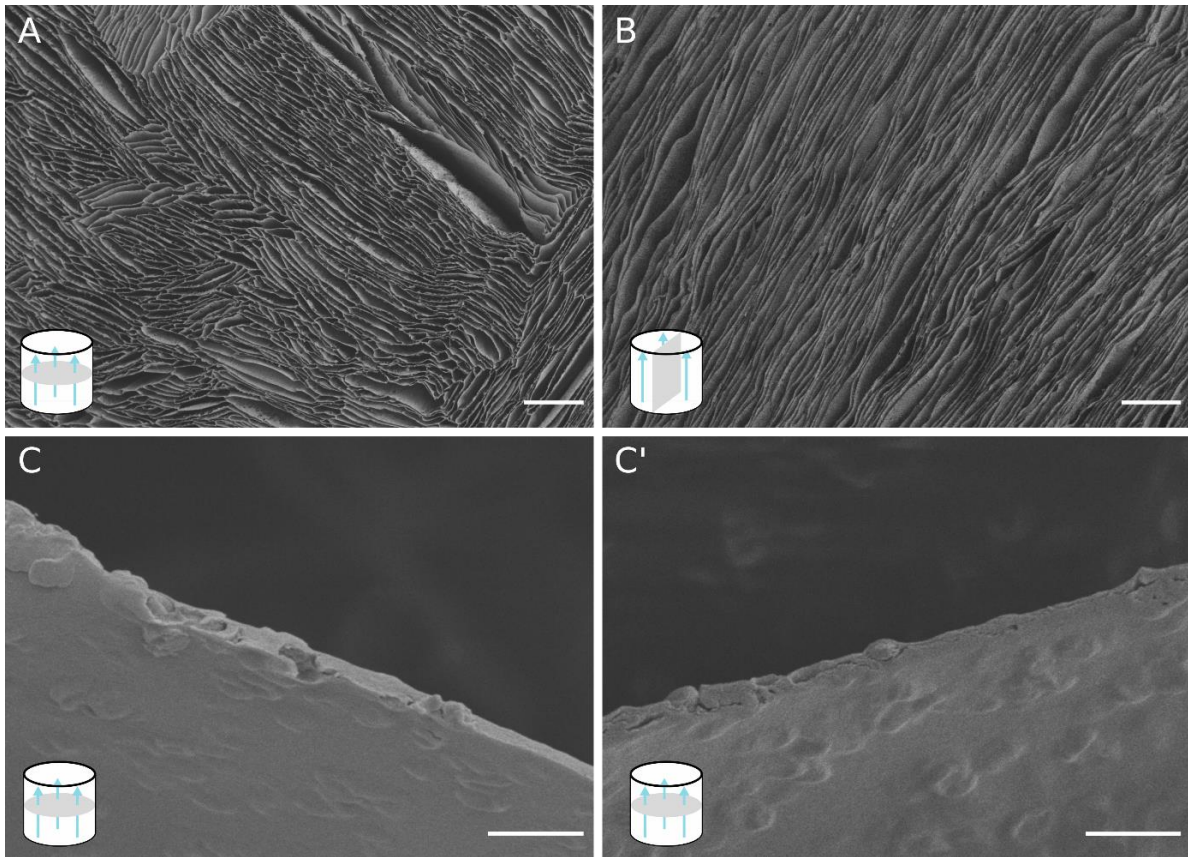
#### *Matériel et méthode : Encapsulation de bactéries et observation MEB*

*Une préculture de Pseudomonas putida est réalisée en mélangeant 100 µL d'un aliquote conservées à -80°C avec 14,9 mL d'une solution de culture de LB Broth (ref). Après une nuit à l'incubateur (35°C et agitation de 150 RPM) 1,2 mL de la préculture sont ajoutés à 58,8 mL de la solution de culture LB Broth et remis à incuber pour une nuit. Les 60 mL de suspension de bactéries ainsi obtenue sont séparés en 2 tubes de 30 mL et centrifugés à 3046 G dans une centrifugeuse pendant 10 min. Les culots sont ensuite dispersés dans 30 mL d'une solution d'alginate à 4 wt% et utilisés directement pour l'encapsulation.*

*Les matrices cellularisées sont alors réalisées par congélation directionnelle : 2 mL de la suspension de bactérie et d'alginate sont versés dans le tube en polystyrène situé au sommet de la tige en aluminium, plongeant dans l'azote liquide. Par le contrôle de la température via une résistance, des vitesses de progression de front de glace de 10, 25 et 50 µm.s<sup>-1</sup> sont appliquées. Les matrices ainsi obtenues sont stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.*

*Pour obtenir des images MEB, ces matrices sont lyophilisées pendant 24 heures et découpées en tranches d'environ 3-4 mm à l'aide d'une lame de rasoir. Puis une couche de 20 nm d'or est déposée avec un métalliseur afin d'éviter l'accumulation d'électrons sur les échantillons non conducteurs. Ces clichés MEB ont ensuite été traités en utilisant le logiciel Fiji et le plugin « MorpholibJ » afin de quantifier les grandeurs caractéristiques.*

L'encapsulation des bactéries *Pseudomonas putida* a été réalisé en utilisant le montage présenté précédemment – où une suspension de bactéries et d'alginate est placée au sommet d'une tige d'aluminium plongée dans de l'azote liquide. Les observations MEB de ces matrices cellularisées sont exposées en Figure II-15. En A – une coupe transversale perpendiculaire à la croissance des cristaux de glace – une structure composée de parois et de pores organisées en différents domaines d'orientation est observée. De même en B – une coupe longitudinale parallèle à la croissance des cristaux de glace – des pores et des parois continues uniformément orientées dans le sens de la croissance de la glace peuvent être observés. De plus, en C et C', des bactéries encapsulées dans les murs sont visibles, présentes dans la coupe du mur et sous la surface de la paroi, créant ainsi les nombreux reliefs d'environ 1 µm de long.

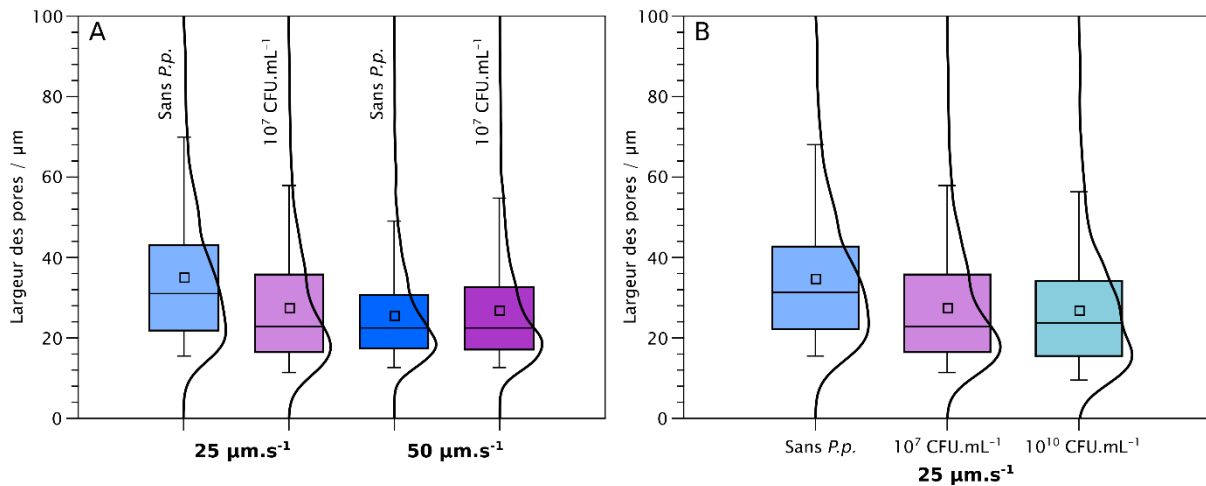


**Figure II-15:** Clichés MEB de matrices cellularisées et lyophilisées. L'image A est une coupe transversale de l'échantillon et la B une coupe longitudinale (dont les orientations sont exprimés par les schémas de matrice en blanc, où les flèches bleues représentent la direction de la croissance de la glace et les parties grises les coupes observées). Les bosses visibles sous la surface des parois des clichés C et C' ainsi que le long de la coupe sont des bactéries de *Pseudomonas putida* encapsulées. Échelle 250  $\mu\text{m}$  (A et B) et 2  $\mu\text{m}$  (C et C'). Concentration initiale de bactéries de  $3,63 \cdot 10^{10}$  CFU/mL.

Ces clichés MEB montrent une conservation de la morphologie imposée par la congélation directionnelle avec des pores organisés en domaines (A) possédant une forte anisotropie (B).

Ainsi ces clichés permettent de confirmer que l'ajout de bactéries ne modifie pas drastiquement la structure obtenue par freeze-casting malgré leur concentration élevée ( $3,63 \cdot 10^{10}$  CFU/mL).





**Figure II-16:** Graphiques de l'évolution de la distance inter-parois (largeur des pores) en fonction de la concentration en bactérie *P.p.* introduites. En A, l'impact de la vitesse sur la taille des pores en présence ou non de bactérie. En B, l'influence de la concentration des bactéries pour une vitesse donnée sur cette largeur des pores.

En traitant les clichés MEB présentés précédemment, une quantification des variations de structure due à la présence de bactéries lors du procédé de freeze-casting est rendue possible. La distance entre les parois (correspondant à la largeur des pores) est mesurée par le diamètre de Feret minimal dont les résultats sont présentés en Figure II-16. La caractérisation des pores par la distance inter-parois est justifiable car ce paramètre joue un rôle important dans la conduction des fluides le long de la matrice<sup>160</sup>. En effet la distance entre les murs définit le transport capillaire des liquides au sein de la matrice (nous n'avons cependant pas analysé le transport de fluide, qui pourrait donner des indications sur la vitesse de front de glace optimale à privilégier).

Dans un premier temps l'évolution de la largeur des pores en fonction de deux vitesses et d'une présence ou non de bactérie est présentée dans le graphique A. Ces données mettent en avant la diminution de la distance entre les parois pour une vitesse de 25 µm.s<sup>-1</sup> lorsque des bactéries sont ajoutées et une conservation de cette distance pour une vitesse de 50 µm.s<sup>-1</sup>. Le graphe B montre l'évolution de cette même largeur des pores à une vitesse donnée – de 25 µm.s<sup>-1</sup> – en fonction de l'augmentation de la concentration en bactérie. Une première diminution peut être observée à une concentration de 10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>, cependant lorsque la concentration augmente, aucune différence significative est observable.

La présence de bactéries lors du procédé de congélation directionnelle ne modifie pas la morphologie globale obtenue grâce à ce procédé : des pores fortement anisotropes dans le sens de la croissance de la glace et organisés en domaines. De plus la présence des bactéries au sein

des parois d'alginate est attestée par les clichés MEB. Les cellules de *Pseudomonas putida* sont observables à travers les coupes et visibles par les déformations de surface des parois. Ainsi le freeze-casting permet bien l'encapsulation de bactéries au sein des parois d'alginate tout en conservant la morphologie contrôlée des matrices. Cependant de légères variations dans les distances inter-murs peuvent être reportées.

Ces faibles différences de dimension suite à l'introduction de bactéries et leur conservation malgré l'augmentation de plusieurs ordres de grandeur de la concentration des *P. putida* interpellent. En effet, l'ajout des bactéries a légèrement diminué la taille des cristaux de glace sans pour autant changer leur morphologie. Les paramètres majeurs influençant la taille de ces cristaux sont les suivants : la vitesse du front de glace (à travers le gradient thermique), la concentration, l'instabilité du front de glace et enfin la viscosité<sup>188,213,296-298</sup>. Lors de l'ajout de particules dans une solution de polymère, la structure des cristaux de glace est en partie dépendante des caractéristiques et concentration du polymère et des particules, cependant le volume des bactéries est très inférieur comparé à celui de l'alginate. En effet pour une concentration de  $10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup> la proportion de bactérie par rapport à l'alginate revient à 7% soit 0,28% de la masse totale de la solution (Calcul en annexes). Il semble donc raisonnable de négliger l'impact sur la morphologie due à cette variation de volume apportée par ces concentrations en bactéries.

Il a été montré dans la littérature que la présence de particules en suspension lors du procédé de freeze-casting induisait une variation locale du gradient thermique<sup>299</sup>. De plus des modèles, décrits par Mullin et Sekerka, prédisent qu'une quantité restreinte de particules est suffisante pour déstabiliser l'interface initial de croissance de la glace, en partie grâce à cette variation locale du gradient<sup>251</sup> et par la modification des énergies de surface. Il est alors possible de formuler l'hypothèse selon laquelle la présence de bactéries – considérées ici comme des particules souples – soit suffisante même en petit nombre pour déstabiliser l'interface planaire initiale de la glace formée par la surfusion. Ainsi l'ajout de bactéries augmenterait l'instabilité de l'interface solution-glace diminuant ainsi leur fréquence de répartition et augmenterait le nombre de cristaux. Cette augmentation du nombre de cristaux se traduirait alors par une diminution de la distance entre les parois.

À travers les expériences présentées dans les chapitres suivants, nous avons remarqué la présence systématique d'une couche d'alginate enveloppant les bactéries. Afin d'essayer d'expliquer la légère variation de distance entre les murs due à la présence des bactéries nous avons formulé l'hypothèse suivante : les bactéries en suspension dans la solution d'alginate



concentreraient le polymère autour d'elles, faisant varier leur diamètre et augmenterait ainsi la viscosité locale. Cependant cette augmentation de la viscosité serait contrebalancée par la diminution de la concentration d'alginate en solution et l'ajout de nouvelles bactéries ne modifierait pas drastiquement cette nouvelle viscosité (en deçà du seuil de percolation).

Des expériences sont nécessaires afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la congélation de nombreuses bactéries en suspension dans un polysaccharide.

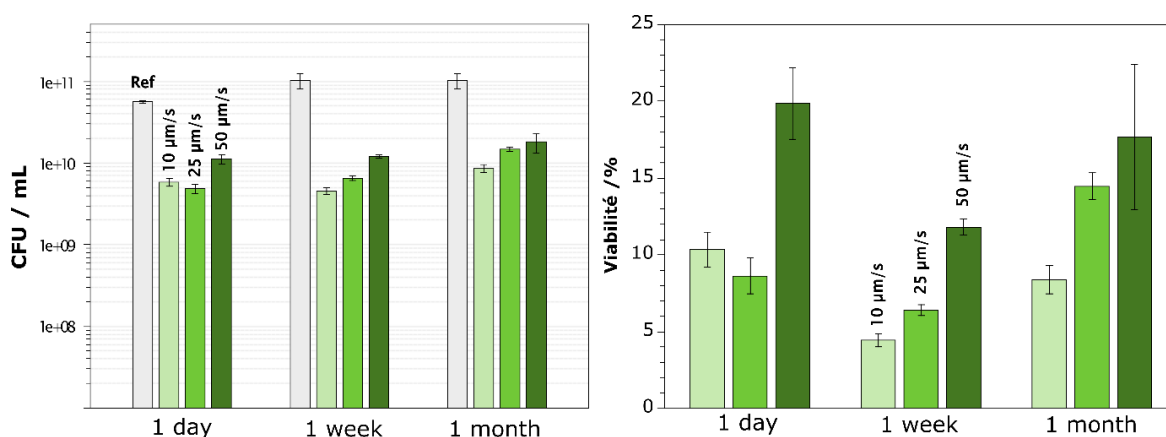
#### II.4.b Viabilité

Bien que les *Pseudomonas putida* étudiés soient encapsulables par freeze-casting, leur survie n'a pas encore été analysée. En effet, lors du procédé de freeze-casting, les bactéries se retrouvent à de basses températures en présence de glace sans aucun cryoprotecteur (autre que l'alginate servant de support matriciel et de cryoprotecteur extra-cellulaire). La déshydratation due à la croissance de cristaux à proximité ainsi que la possibilité de nucléation intra-cellulaire (suivie d'une croissance interne des cristaux) peuvent être des phénomènes critiques pour la survie des bactéries. Les clichés MEB réalisés ne permettent pas de déterminer la viabilité des bactéries encapsulées. Ainsi leur viabilité après encapsulation doit être mesurée – par déstructuration et comptage en boîte de Petri – afin d'évaluer les différents leviers pouvant influencer leur survie.

##### *Matériel et méthode : Viabilité des bactéries*

*Une préculture de Pseudomonas putida est réalisée en mélangeant 100 µL d'un aliquote conservés à -80°C avec 14,9 mL d'une solution de culture de LB Broth. Après une nuit à l'incubateur, 1,2 mL de la préculture sont ajoutés à 58,8 mL de LB Broth pour former une solution de culture remise à incuber pour une nuit. Les 60 mL de suspension de bactéries ainsi obtenues sont séparés en 2 tubes de 30 mL et centrifugés à 3046 G pendant 10 min. Les culots sont ensuite dispersés dans 30 mL d'une solution d'alginate à 4 wt% et utilisés directement pour l'encapsulation. La suspension obtenue correspond alors à une concentration initiale de l'ordre de grandeur de 10<sup>10</sup> CFU/mL. Différentes concentrations initiales sont testées en diluant les culots des cultures centrifugées dans différents volumes de solution d'alginate à 4 wt%. Afin de mesurer ces concentrations initiales, un comptage du nombre de colonies en boîte de Petri est réalisé : pour cela 100 µL de la suspension sont prélevés et rajoutés à 900 µL d'eau ultrapure et stérilisée. Les dilutions alors effectuées successivement sont étalées en boîte de Petri pour obtenir des concentrations en bactéries de l'ordre de la centaine de colonie par boîte.*

Les matrices cellularisées sont alors formées par congélation directionnelle : 2 mL de la suspension de bactéries et d'alginate sont versés dans le tube en polystyrène situé au sommet de la tige en aluminium plongeant dans l'azote liquide. Par le contrôle de la température via une résistance, des vitesses de progression de front de glace de 10, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  sont appliquées. Les matrices ainsi obtenues sont stockées à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. Afin de mesurer la viabilité des bactéries lors de leur encapsulation, la déstructuration des matrices est nécessaire et se réalise par la décongélation dans 20 mL d'eau ultrapure à  $30^\circ\text{C}$  pendant 10min. Puis après centrifugation de 10 min, les culots sont redispersés dans 10mL d'eau ultrapure et stérile. Les dilutions et l'étalage en boîte de Petri permettent alors de compter le nombre de bactéries ayant survécu au processus de congélation directionnelle (Figure II-17). Pour étudier l'impact du temps de stockage à  $-80^\circ\text{C}$  sur la viabilité des bactéries, certaines matrices (de concentration initiale  $5,6\cdot 10^{10}$  et de  $10^{11}$ ) sont laissées pendant différents temps à  $-80^\circ\text{C}$ . Puis le processus de comptage est reproduit après le temps souhaité (Figure II-18).



**Figure II-17:** Viabilité des *Pseudomonas putida* encapsulées par freeze-casting, pour différents temps de stockage à  $-80^\circ\text{C}$ . (a) Évolution de la viabilité représentée en nombre de bactéries par mL obtenue par comptage en boîte de Petri. Comparaison des différentes vitesses du front de glace avec la référence (concentration de bactéries dans la suspension avant freeze-casting). (b) Représentation en pourcentage de viabilité par rapport à la référence.

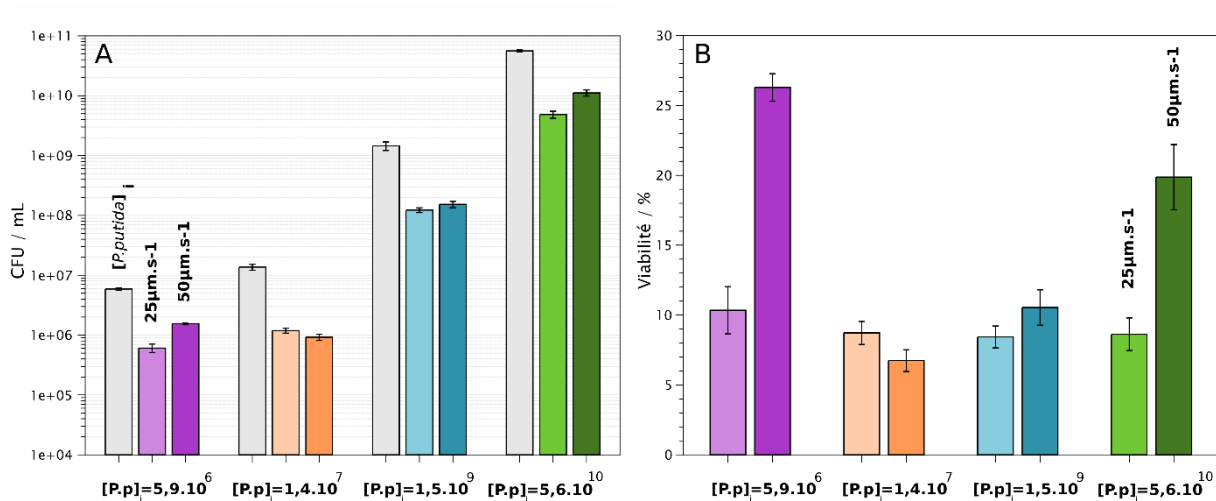
La survie des *Pseudomonas putida mt-2* a été mesurée après le processus de congélation directionnelle par comptage en boîte de Petri. En effet le comptage de bactéries encapsulées dans des matrices 3D reste aujourd'hui un défi<sup>300</sup>. Afin d'évaluer les différents paramètres clés pour leur survie, deux principales conditions ont été testées : la concentration initiale des bactéries et la vitesse du front de glace.

L'influence des vitesses du front de glace sur la survie des bactéries est exposée en Figure II-17, de plus le temps de stockage à  $-80^\circ\text{C}$  après freeze-casting est aussi évalué afin de rendre

compte du potentiel du procédé pour l'encapsulation des bactéries et la conservation de leur viabilité. Le graphique de gauche représente le nombre de colonies comptées en boîte de Petri avec, en gris, la quantité initiale de bactéries introduite dans le moule de polystyrène (représenté en CFU.mL<sup>-1</sup> avec 2 mL par échantillon) et en couleur la survie après congélation à différentes vitesses du front de glace, soit 10, 25 et 50  $\mu\text{m.s}^{-1}$  (plus la couleur est sombre plus la vitesse augmente). Les différents comptages ont été réalisés après un jour, une semaine et un mois de stockage à -80°C après avoir décongelé les matrices à 30°C pendant 10 min dans de l'eau stérile. Le graphique de droite est une représentation du taux de survie en pourcentage par rapport à la concentration initiale.

On peut premièrement observer que la survie après freeze-casting ne diminue que d'un ordre de grandeur pour chaque vitesse. Il semble que la vitesse de progression du front de glace ayant obtenu les meilleurs taux de survie soit à chaque fois 50  $\mu\text{m.s}^{-1}$ . De plus le fait de stocker ces bactéries encapsulées par congélation directionnelle pendant une semaine et un mois ne semble pas changer drastiquement leur survie qui reste satisfaisante, les ordres de grandeur sont conservés.

L'influence de la concentration initiale des *Pseudomonas putida* sur leur viabilité après congélation directionnelle a été mesurée pour 4 concentrations d'ordre de grandeurs différents allant de 10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> à 10<sup>10</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. La Figure II-18 A met en avant les résultats de survie bactérienne après congélation directionnelle obtenus en CFU.mL<sup>-1</sup>. Les concentrations initiales des suspensions freeze-castées sont représentées en gris et leur survie en fonction de la vitesse du front de glace en couleur. Pour la figure B les mêmes résultats sont présentés cette fois en pourcentage de survie comparativement à la concentration initiale des suspensions.



**Figure II-18:** Viabilité des *Pseudomonas putida* après freeze-casting. (a) Comparaison de la viabilité en fonction de la concentration initiale (variant entre  $5,9.10^6$  et  $5,6.10^{10}$ ) et de la vitesse (25 et  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$ ) mesurée en  $\text{CFU.mL}^{-1}$ . (B) Représentation en pourcentage de la viabilité présentée en (A) par rapport à la concentration initiale de la suspension de *Pseudomonas putida*.

Premièrement on peut noter la conservation de la survie bactérienne suite au procédé d'encapsulation par freeze-casting, de l'ordre de la dizaine de pourcent pour chaque concentration initiale. Cette perte de seulement un ordre de grandeur en viabilité varie cependant en fonction de la vitesse du front de glace et de la concentration. On peut ainsi voir que pour la vitesse de  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$  le taux de survie ne varie pas significativement lorsque la concentration initiale de *P.p.* change. Cependant pour la vitesse de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  des variations du taux de survie en fonction de la concentration initiale ont été mises en évidence. En effet, Il s'avère que ce taux de survie est maximal pour la concentration de  $5,9.10^6 \text{CFU.mL}^{-1}$  et diminue pour  $1,4.10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  puis augmente progressivement lorsque la concentration initiale augmente.

Comme montré dans les graphes précédents, la viabilité est plus élevée lorsque la vitesse du front de glace augmente. En effet, le taux de survie à une vitesse de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  est supérieur à celle de  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$ . Cependant la diminution de viabilité observée lorsque la concentration initiale de bactérie se trouve entre  $10^6$  et  $10^{10} \text{CFU.mL}^{-1}$  est intrigante car pour la concentration initiale de  $1,4.10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  le taux de survie à  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$  est supérieur à celui de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$ .

Selon la prédiction de l'hypothèse des deux facteurs<sup>238</sup> (décrite plus tôt) il y aurait une vitesse optimale de descente en température où l'influence de la vitesse de déshydratation et de la possible croissance de glace intracellulaire atteint un équilibre permettant la survie maximale.

Cependant le montage utilisé lors de cette thèse ne permet pas d'atteindre des vitesses supérieures à  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$ . Ainsi une viabilité supérieure pourrait être possiblement atteinte avec

une vitesse de front de glace supérieure ou bien au contraire une diminution pourrait être observée. Une modification du montage est nécessaire afin de répondre à cette question – en utilisant une tige de métal avec une conductivité thermique supérieure par exemple.

Il est important de noter aussi que la quantité de bactéries actives est un levier important pour l'efficacité de la dépollution, ainsi bien que le taux de survie puisse être supérieur pour une basse concentration initiale comme  $5,6 \cdot 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>, la quantité totale de bactéries aptes à dépolluer sera plus faible que pour une concentration initiale avec  $1,5 \cdot 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> avec un taux de survie légèrement plus faible.

Grâce aux expériences de DSC présentées plus tôt, il est possible d'expliquer la meilleure viabilité lorsque la vitesse du front de glace augmente. Sur le diagramme de composition, nous avons émis l'hypothèse que lorsque la vitesse du front de glace augmentait, la température de transition vitreuse du mélange se décale vers des températures plus élevées, modifiant alors le point d'intersection avec la courbe du *liquidus*. Ainsi un comportement vitreux serait atteint à des températures plus élevées et une proportion plus importante d'eau serait conservée à proximité des bactéries limitant ainsi l'impact délétère de la déshydratation. Bien qu'une vitesse plus élevée aille de pair avec une déshydratation plus rapide – comme nous l'avons montré précédemment<sup>295</sup> – il semblerait que les *Pseudomonas putida* y soit tolérantes. Il est possible que des vitesses de progression du front de glace encore supérieures résultent en l'amélioration de la survie des bactéries, jusqu'à atteindre la vitesse optimale évoqué dans l'hypothèse des deux facteurs.

Afin d'expliquer l'impact de la concentration initiale des bactéries sur la survie, on peut formuler l'hypothèse que plus la concentration initiale est élevée (dans la limite des concentrations étudiées ici) plus les agrégats de bactéries formés les protègent des effets de la déshydratation. L'alginate est de plus un polymère très utile pour conserver l'humidité d'un milieu et est produit rapidement par les *P.p.* (ainsi que de la cellulose)<sup>268,269,301</sup> en réponse à une déshydratation. Cela leur permet une meilleure tolérance au stress ainsi induit en limitant la diffusion des molécules d'eau et en contribuant à la conservation de la structure. Il est aussi possible que les agrégats de bactéries créent une concentration locale élevée et permet d'atteindre l'état vitreux plus tôt limitant les effets de la déshydratation.

## II.5 Conclusion

Ce premier chapitre s'est focalisé sur le procédé de congélation directionnelle, tant pour sa capacité de structuration des matrices que pour son potentiel d'encapsulation.

Le contrôle de la vitesse de progression du front de glace a été la première étape atteinte afin d'obtenir un contrôle sur la morphologie des matrices. En effet, l'obtention d'un front de glace de vitesse constante permet d'instaurer une taille de pore régulière tout au long des matrices. De plus, l'influence de la vitesse du front de glace sur l'évolution de la morphologie des pores a été étudiée, et les résultats obtenus coïncident avec ceux reportés dans la littérature. Ainsi lorsque la vitesse du front de glace augmente, l'instabilité de l'interface solution-glace augmente, les cristaux sont alors plus nombreux et leur taille diminue. Les pores des aérogels obtenus après lyophilisation de ces matrices congelées, possèdent alors la même dépendance morphologique à la vitesse de propagation du front de glace.

Les phénomènes advenant lors de la congélation directionnelle ont été étudiés par DSC et par microscopie confocale. Ainsi, lors de la déshydratation subvenant au cours de la ségrégation de phase, une composition critique du mélange concentré entre les cristaux a pu être observée. Cette fraction volumique de polymère critique, déterminée par l'intersection entre la courbe du *liquidus* et celle de la température de transition vitreuse, permet de fixer la composition limite à partir de laquelle une vitrification du mélange survient. Cependant, le phénomène de transition vitreuse étant éminemment cinétique, l'intersection des deux courbes définissant  $\phi_{crit}$  dépend elle aussi de la vitesse de progression du front de glace. Ainsi, lorsque cette vitesse augmente la  $\phi_{crit}$  diminue mais est atteinte plus rapidement. Ces expériences permettent d'estimer l'évolution du microenvironnement encadrant les bactéries encapsulées.

Le procédé de congélation directionnelle a été employée avec succès pour l'encapsulation de bactéries, piégées dans les parois des matrices d'alginate. De plus, la structure macroporeuse et anisotrope est conservée après l'ajout des *P. putida*. Différentes vitesses de propagation du front de glace ont été expérimentées et des taux de survie compris entre 10 et 20 % ont été obtenus. Les viabilités les plus prometteuses ont été obtenues à la vitesse maximale atteignable avec le montage utilisé, soit  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . De plus, la viabilité des bactéries est préservée lorsque les matrices cellularisées sont conservées à  $-80^\circ\text{C}$  (jusqu'à un mois). Le procédé de congélation directionnelle est donc efficace pour structurer des matrices macroporeuses et encapsuler des bactéries. Ce procédé possède alors le potentiel pour la formation de matériaux cellularisés pour la biodégradation.



# **Chapitre III : Stabilisation des matrices d'alginate obtenues par congélation directionnelle**





### III.1 Stabilisation par réticulation ionique et amélioration

Les études réalisées dans le chapitre précédent ont permis d'apercevoir les conditions optimales tant pour la structure que pour la survie bactérienne lors de l'étape de congélation. Cependant, afin de pouvoir traiter des eaux usées avec de telles matrices, des étapes supplémentaires sont nécessaires. En effet, une fois les suspensions de bactéries et d'alginate congelées une étape de lyophilisation est nécessaire pour sublimer les cristaux de glace et obtenir des aérogels. Malheureusement le procédé de freeze-casting n'induit pas d'enchevêtrement (nœuds physiques) assez résistant pour consolider les aérogels en milieu aqueux, ainsi ils se déstructurent et se dispersent lorsqu'ils sont dans un environnement humide. Une étape de stabilisation est donc nécessaire afin de rendre insoluble les matrices pour rendre possible leur utilisation en dépollution de milieu aqueux pollués.

Une stratégie couramment utilisée pour stabiliser les matrices d'alginate est la formation de gel par la réticulation aux ions calcium<sup>1,271,272,302,303</sup>. Comme présenté au chapitre précédent, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  vont venir former des complexes dans les cavités formées par les blocs guluronate présents dans les chaînes d'alginate. Les chaînes forment ainsi plusieurs cavités et un dimère en structure de boîte à œuf est obtenu (le terme « egg-box » est alors utilisé dans la littérature faisant référence à cette structure). Ces dimères vont ensuite pouvoir s'assembler en multimères pour former un gel<sup>272</sup>. Ce gel est stable en milieu aqueux tant que la compétition avec d'autres sels n'est pas critique. Le sel le plus couramment utilisé pour réticuler l'alginate est le chlorure de calcium, son efficacité (caractérisable par la rapidité de la réticulation et la force de la liaison), sa solubilité et son faible coût en font effectivement un candidat de premier ordre.<sup>1,162,304</sup>

Cependant il est probable que chaque étape du protocole pour l'obtention d'hydrogels structurés et cellularisés impose des stress aux bactéries encapsulées dans les parois du matériau. Ainsi nous avons choisi de quantifier la viabilité des *Pseudomonas putida* encapsulées après la lyophilisation et la réticulation.

### III.1.a Stabilisation des matrices structurées par freeze-casting : lyophilisation et réticulation

La stabilisation des matrices d'alginate par réticulation aux ions calcium est un procédé rapide permettant l'obtention de gels stables en milieu aqueux. Pour les réticuler il faut tout d'abord sublimer les cristaux de glace par lyophilisation puis l'aérogel obtenu pourra être stabilisé en étant plongé dans un bain de calcium. Ces différentes étapes, de lyophilisation et de réticulation, peuvent exercer une influence sur la survie des bactéries encapsulées et impacter l'activité de biodégradation du matériau final. Ainsi, afin d'analyser l'impact de ces étapes sur la survie, des bactéries en suspension dans des solutions d'alginate à 4 wt% sont structurées par congélation directionnelle à une vitesse de  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et leur survie après freeze-casting est mesurée pour servir de référence. Puis les matrices sont lyophilisées pendant 24 heures et une nouvelle mesure de viabilité est réalisée – pour cela les aérogels sont déstructurés dans de l'eau DI puis les bactéries sont récupérées par centrifugation et comptées en boîte de Petri. Enfin le reste des aérogels cellularisés sont plongés dans un bain de chlorure de calcium à 1 M pendant 30 min (ces aérogels étant macroporeux la diffusion de la solution réticulante au sein du matériau se fait en quelques secondes et n'est pas un facteur limitant du procédé) et est ensuite lavée à l'eau DI. Les hydrogels obtenus sont très stables dans l'eau et peuvent être stockés plusieurs mois en solution sans modification apparente (pour les hydrogels non-cellularisés) – en présence de bactéries le stockage en solution doit être étudié. Cette stabilité pose cependant un problème lors de la quantification de la survie des bactéries encapsulées. En effet, la déstructuration des matrices indispensable à la mesure de la viabilité nécessite l'utilisation d'une solution spécifique contenant des chélateurs d'ions calcium. Cette solution de déstructuration se doit alors d'impacter le moins possible la viabilité des bactéries.

Les travaux de Mater *et coll*<sup>300</sup> ont mis en évidence la possibilité d'utiliser une telle approche. Ils ont encapsulé deux souches différentes de *Pseudomonas putida* dans des billes d'alginate (gels réticulés par des solutions de chlorure de calcium) qu'ils ont ensuite déstructurés avec un mélange de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) et acide citrique (AC) en solution aqueuse. Le mélange optimal est de 0,05 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et 0,02 M de AC et permet de conserver jusqu'à 100% de viabilité tout en chélatant le calcium et solubilisant les gels.

Ainsi les derniers triplicatas des matrices obtenues après congélation directionnelle, lyophilisation et réticulation sont déstructurés avec la solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,05 M et

0,02 M AC. Les bactéries récupérées par centrifugation sont alors mises en boîte de Petri pour le comptage. Les résultats sont présentés en Figure III-1.

#### *Matériel et méthode : Viabilité après lyophilisation et réticulation*

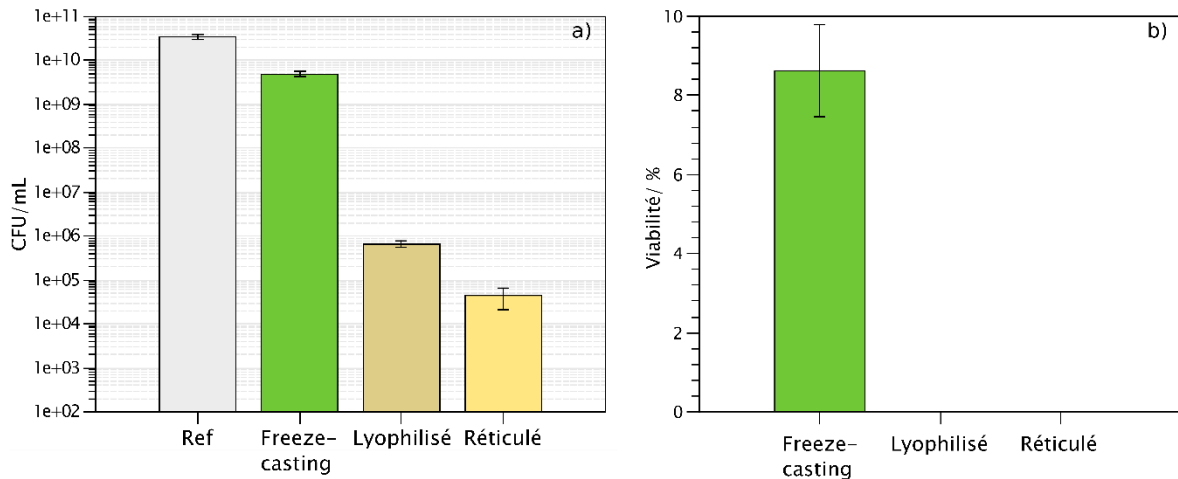
*Une préculture de P. putida est réalisée en mélangeant 100 µL d'aliquote conservés à -80°C avec 14,9 mL d'une solution de culture de LB Broth. Après une nuit à l'incubateur (35°C et agitation orbitale de 150 RPM) 1,2 mL de la préculture sont ajoutés à 58,8 mL de la solution de culture LB Broth et remis à incuber pour une nuit. Les 60 mL de suspension de bactéries ainsi obtenues sont séparés en 2 tubes de 30 mL et centrifugés à 3046 G dans une centrifugeuse pendant 10 min. Les culots sont ensuite dispersés dans 30 mL d'une solution d'alginate à 4 wt% et utilisés directement pour l'encapsulation. La suspension de P. putida dans la solution d'alginate obtenue (concentration initiale de l'ordre de grandeur de 10<sup>10</sup> CFU/mL) est ensuite utilisée pour l'encapsulation. Différentes concentrations initiales sont testées en diluant les culots des cultures centrifugées dans différents volumes de solution d'alginate à 4 wt%. Afin de mesurer ces concentrations initiales, un comptage de colonie en boîte de Petri est réalisé : pour cela 100 µL de la suspension sont prélevés et rajoutés à 900 µL d'eau déionisée et stérilisée. Les dilutions alors effectuées successivement et étalées en boîte de Petri permettent d'obtenir une concentration en bactérie comptable de l'ordre de la centaine de colonie par boîte.*

*Les matrices cellularisées sont alors formées par congélation directionnelle : 2 mL de la suspension de bactérie dans la solution d'alginate sont versés dans le tube en polystyrène situé au sommet de la tige en aluminium plongeant dans l'azote liquide. Par le contrôle de la température via une résistance et des descentes en température contrôlées, une vitesse de progression de front de glace de 25 µm.s<sup>-1</sup> est appliquée (en utilisant les équations de Stolze et al.<sup>289</sup> Décrites au chapitre précédent). Les matrices ainsi obtenues sont stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.*

*Afin de mesurer la viabilité des bactéries lors de leur encapsulation, la déstructuration des matrices est nécessaire et se réalise par la décongélation dans 20 mL d'eau déionisé à 30°C pendant 10min. Puis après centrifugation de 10 min, les culots sont redispersés dans 10mL d'eau stérile. Les dilutions et l'étalage en boîte de Petri permettent alors de compter le nombre de bactéries ayant survécu au processus de congélation directionnelle. Ces échantillons réalisés en triplicata sont notés « Freeze-casting » dans les graphiques.*

*Des matrices équivalentes sont lyophilisées pendant 24 heures avant d'être dispersées dans 20 mL d'eau DI puis suivent le même protocole que précédemment. Ces triplicatas sont nommés « lyophilisés ». Un autre triplicata de matrices équivalentes est lyophilisé puis plongé dans une*

solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1M pendant 30 min. Ces matrices sont déstructurées dans 20 mL d'une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,05M) et d'AC (0,02M) pendant 30 min avant de suivre le protocole de comptage en boîte de Petri<sup>300</sup> et sont nommée « réticulée ».



**Figure III-1:** Graphiques représentant l'impact des différentes étapes sur la viabilité des bactéries encapsulées par freeze-casting pour l'obtention d'un hydrogel cellularisé. (a) Comparaison de la survie après congélation, lyophilisation puis réticulation dans une solution de chlorure de calcium. (b) Représentation de ces mêmes données en pourcentage par rapport à la concentration de bactérie initiale.

La Figure III-1 présente les résultats de survie des *Pseudomonas putida* encapsulées aux différentes étapes d'obtention de l'hydrogel final. La référence est la quantité de bactéries par mL dans la solution initiale utilisée lors de l'étape de congélation directionnelle, ici d'environ  $3,5 \cdot 10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Le graphique (a) représente la survie à chaque étape en concentration de bactéries alors que le graphique (b) la représente en pourcentage de la concentration initiale.

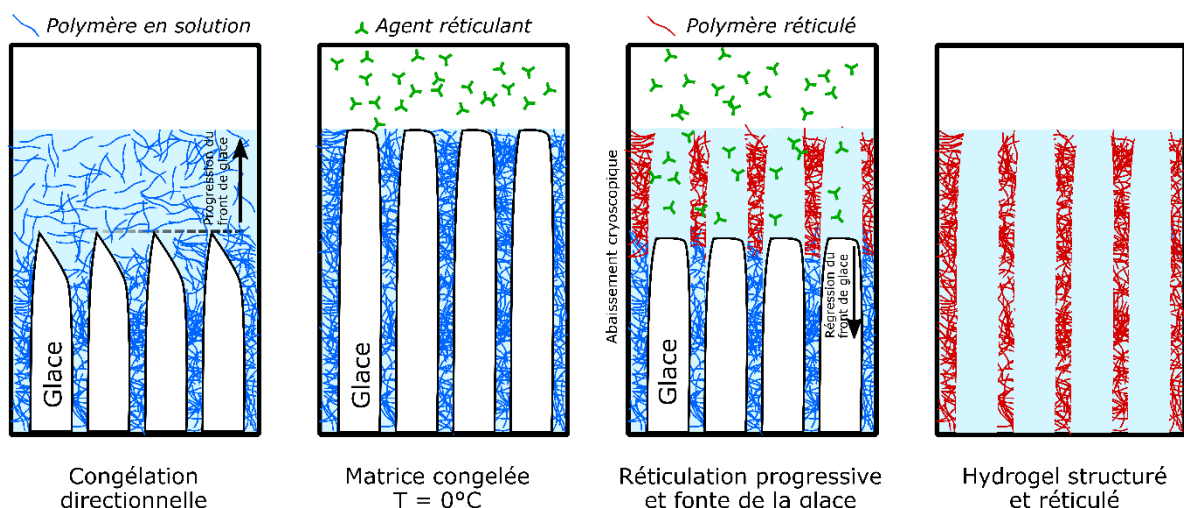
La survie après congélation directionnelle est cohérente avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent, avec la perte d'un seul ordre de grandeur (1 log). La viabilité après lyophilisation a diminué de plusieurs ordres de grandeurs (5 par rapport à la référence et 4 par rapport à l'étape de freeze-casting). La survie finale, dans l'hydrogel après réticulation, a aussi diminué par rapport à l'étape précédente d'un ordre de grandeur. La viabilité finale obtenue dans les hydrogels est alors extrêmement basse, avec une perte de 6 logs par rapport à la quantité de bactéries initialement congelées.

L'utilisation de ces étapes de lyophilisation et de réticulation sont à proscrire pour des applications finales de dépollution. Nous avons modifié ce protocole afin d'améliorer la survie

bactérienne tout en obtenant un hydrogel stable et cellularisé comme matériau final. Il est alors important de trouver une alternative au procédé de lyophilisation tout en modifiant le nombre d'étape du nécessaire. En effet la lyophilisation est l'étape critique du protocole (où la plus grande perte de viabilité est observée), de plus chacune des étapes induit un stress aux bactéries encapsulées, il est alors préférable de réduire le nombre d'étapes.

### III.1.b Réticulation topotactique des matrices d'alginate cellularisées

Développé récemment au laboratoire, le procédé de fibrilogenèse topotactique a tout d'abord été mis au point pour la stabilisation de matrices de collagène structurées par congélation directionnelle<sup>199</sup>. Cette méthode est schématisée dans la Figure III-2. Ainsi, après l'obtention d'une matrice congelée – par freeze-casting – elle est thermostatée à 0°C et un agent réticulant est ajouté. L'agent réticulant doit répondre à au moins deux critères : il doit pouvoir stabiliser le polymère utilisé – par la formation d'un gel chimique ou physique – et il doit induire un abaissement cryoscopique de la glace (un abaissement de la température de fusion). La glace alors en contact avec l'agent réticulant va donc fondre progressivement tout en découvrant le polymère qui peut alors être réticulé par cet agent. Cette simultanéité de fonte et de réticulation permet alors de conserver la structure imposée par les cristaux de glace lors de l'étape de congélation. Ainsi, sans déshydratation ni réhydratation induisant des stress aux cellules encapsulées, un hydrogel structuré et stable dans l'eau est obtenu en une seule étape.



**Figure III-2:** Schéma représentant le principe général de la réticulation topotactique tel qu'utilisé précédemment au laboratoire. Premièrement, une solution de polymère est structurée par congélation directionnelle. Une fois la matrice congelée, elle est placée à 0°C et un agent réticulant est ajouté. Cet agent réticulant induit un abaissement de la température de fusion de la glace en contact (abaissement

*cryoscopique) et peut ainsi réticuler et stabiliser les parois de polymère. Une fois toute la glace fondue un hydrogel stable est obtenu ayant conservé la structure définie par freeze-casting. Adapté de L'HDR de F.M. Fernandes<sup>305</sup>.*

Dans le cadre de ces travaux effectués au laboratoire, des matrices de collagènes de type I (protéine la plus abondante dans la matrice extracellulaire chez les mammifères) ont été structurées par congélation directionnelle, puis stabilisées en utilisant comme agent réticulant de la vapeur d'ammoniac<sup>199</sup>. Cette vapeur va pouvoir faire fondre la glace et induire une stabilisation du collagène. Cette stabilisation est différente d'une réticulation ionique, c'est une précipitation isoélectrique : au pH imposé par l'ajout d'ammoniac, les molécules de collagène possèdent autant de charges positives que négatives et s'agrègent en formant un réseau insoluble hydraté, un hydrogel.

Ce procédé de fibrillogenèse topotactique est efficace pour les matrices de collagène, mais peut-il être adapté aux matrices d'alginate ?

### *III.1.b.i Élaboration du procédé de réticulation topotactique*

L'adaptation de cette technique aux matrices d'alginate s'est faite en plusieurs étapes. Tout d'abord le choix de l'agent réticulant fut abordé. Pour l'alginate, le chlorure de calcium était naturellement désigné. En effet, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  permettent de réticuler les chaînes d'alginate en formant les structures du type « egg-box ». Comme toute solution ionique, la présence des ions en solution induit un abaissement cryoscopique. Contrairement à la vapeur d'ammoniac utilisée pour la stabilisation de matrices de collagène – où la fibrillogenèse était induite par un gaz ajouté au monolithe congelé – nous proposons ici une stratégie où l'agent réticulant est en solution, respectant les deux critères énoncés précédemment : induction d'un abaissement cryoscopique de la glace et stabilisation des chaînes de polymère. Émergent alors les questions de concentration, de volume et de temps de réticulation. Afin de les aborder, il est important de noter que ces questions sont fortement dépendantes d'un autre paramètre du procédé qu'est la température. Nous allons voir ici l'évolution du procédé dont nous discuterons les résultats et analyses après.

Des expériences préliminaires ont été réalisées avec un protocole proche de celui développé précédemment au LCMCP pour le collagène. Ainsi les matrices structurées par congélation directionnelle ont été thermostatées à 0°C en plongeant leurs flacons dans un bain de glace. Les matrices ont ensuite été immergées dans une solution de chlorure de calcium à 1 mol.L<sup>-1</sup> pendant différents temps : entre deux et trois jours sont nécessaires à la stabilisation complète

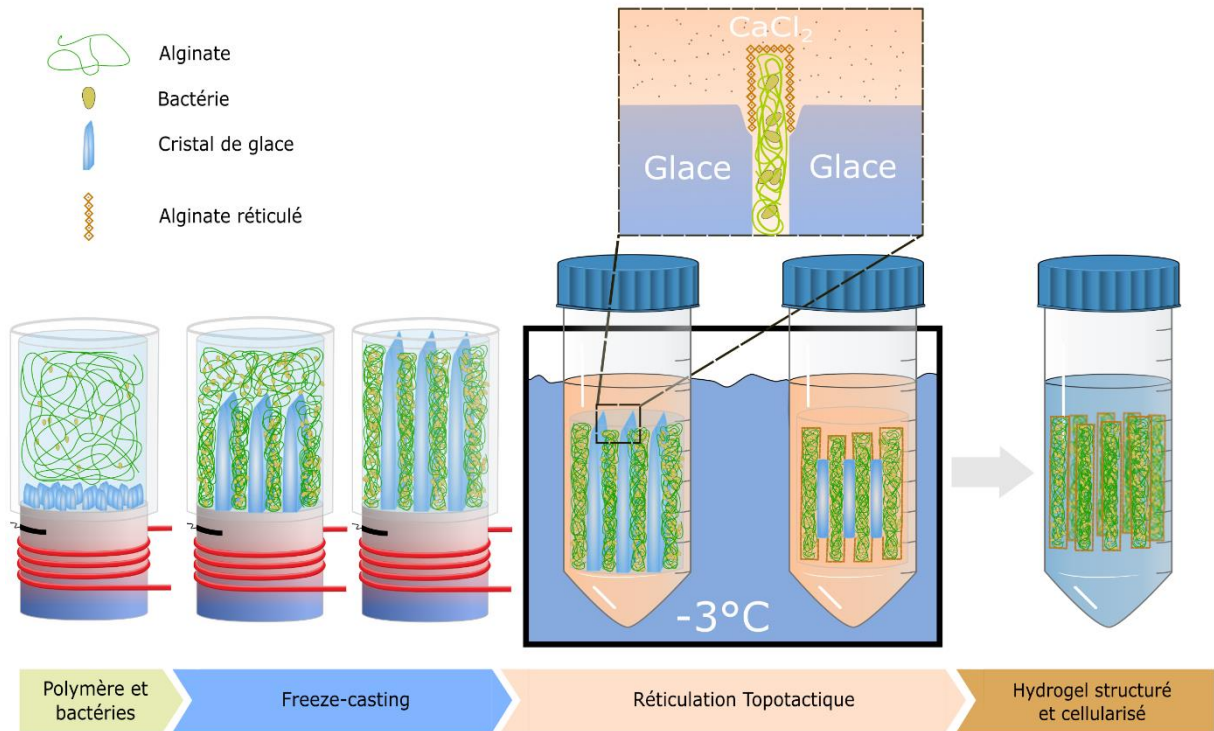
des matrices. Des clichés des matrices ainsi obtenues sont analysées et nous discuterons les résultats ultérieurement.

Une seconde approche a ensuite été mise au point en remplaçant le bain de glace par un bain thermostaté à  $-3^{\circ}\text{C}$ . Ce changement de température permet une nette séparation entre la glace au cœur des matrices qui peut ainsi rester congelée et la glace au contact de l'agent de réticulation qui va pouvoir fondre grâce à l'abaissement cryoscopique. La compétition entre la cinétique de la fonte de ces deux zones congelées – au contact de la solution de chlorure de calcium, et au cœur du matériau – est l'axe primordiale pour mener à bien la réticulation topotactique dont nous discuterons prochainement. Les résultats de cette amélioration seront discutés ultérieurement.

De légères, mais néanmoins importantes, modifications ont été apportées afin d'améliorer encore le procédé. Dans les expériences précédentes les matrices congelées restaient fixées dans les tubes en polystyrène utilisés lors de la congélation directionnelle. L'extraction des matrices congelées de leurs moules a été réalisée avant la réticulation topotactique et les solutions de réticulation sont mises préalablement à  $-3^{\circ}\text{C}$  afin d'homogénéiser la température de la solution de réticulation. Le temps de réticulation a ainsi pu être diminué.

Le protocole de réticulation topotactique appliqué aux matrices d'alginate que nous avons alors retenu est schématisé en Figure III-3.





**Figure III-3:** Schéma complet du procédé pour former des hydrogels cellularisés via l'étape de réticulation topotactique. À gauche, le procédé de congélation directionnelle est représenté, avec l'utilisation d'une suspension de bactéries (représentées en jaune) dans une solution d'alginate à 4 wt% (en vert). Par le contrôle de la température via une résistance, un front de glace de vitesse constante est appliqué. Ces matrices congelées sont ensuite stabilisées par réticulation topotactique : elles sont plongées, sans leurs moules de polystyrène, dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  pré-thermalisée, représentée en beige, à  $-3^\circ\text{C}$  pendant 3 jours.

La Figure III-3 décrit l'ensemble du protocole retenu pour l'obtention d'hydrogels cellularisés. Pour la stabilisation de ces matrices, 20 mL d'une solution de chlorure de calcium à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  préalablement thermalisée sont utilisées pour induire la réticulation. La matrice congelée est extraite de son tube de polystyrène puis est plongée dans cette solution elle-même mise dans un bain thermostaté à  $-3^\circ\text{C}$ . À cette température, la matrice reste congelée mais les cristaux en contact avec la solution vont fondre grâce à l'abaissement cryoscopique produit par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$ . Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  vont alors avoir directement accès aux parois d'alginate et vont pouvoir les réticuler – en formant les complexes en forme de « egg-box » avec les groupements carboxylates entre deux groupes GG (succession de deux monomères guluronique). Une fois toute la glace fondue, la matrice est entièrement stable dans l'eau, des clichés réalisés au MEB sont présentée dans la Figure III-4 (C).

Les différentes itérations du protocole développé au LCMCP permettent alors de répondre à la question de l'adaptabilité du protocole de fibrillogenèse topotactique aux matrices

d'alginate : la réticulation topotactique des matrices d'alginate permet-elle une conservation de la structure induite par la congélation directionnelle lors de sa gélification ?

*Matériel et méthode : Réticulation topotactique de matrices d'alginate*

*Les matrices ont été réalisées comme décrit au chapitre précédent avec une solution d'alginate de sodium à 4 wt% où 2 mL ont été congelées à une vitesse de  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  puis conservées à  $-80^\circ\text{C}$ .*

*Pour la première méthode un bain de glace est utilisé et les matrices congelées sont placées (toujours dans leurs moules de polystyrène) dans des falcons de 50 mL remplis de 20 mL d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1M pendant 2 jours. (A et A'). Pour améliorer la reproductibilité un bain isotherme à  $-3^\circ\text{C}$  est utilisé pour la deuxième méthode, avec un temps de réticulation de 3 jours cette fois ci, toujours dans 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  à 1 M (B et B'). Enfin une version finale est élaborée où le tube de polystyrène est retiré à l'aide de pince coupante et la solution de  $\text{CaCl}_2$  est thermalisée à  $-3^\circ\text{C}$ , la matrice est placée dans les 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  à 1M pendant 3 jours à  $-3^\circ\text{C}$  (C et C').*

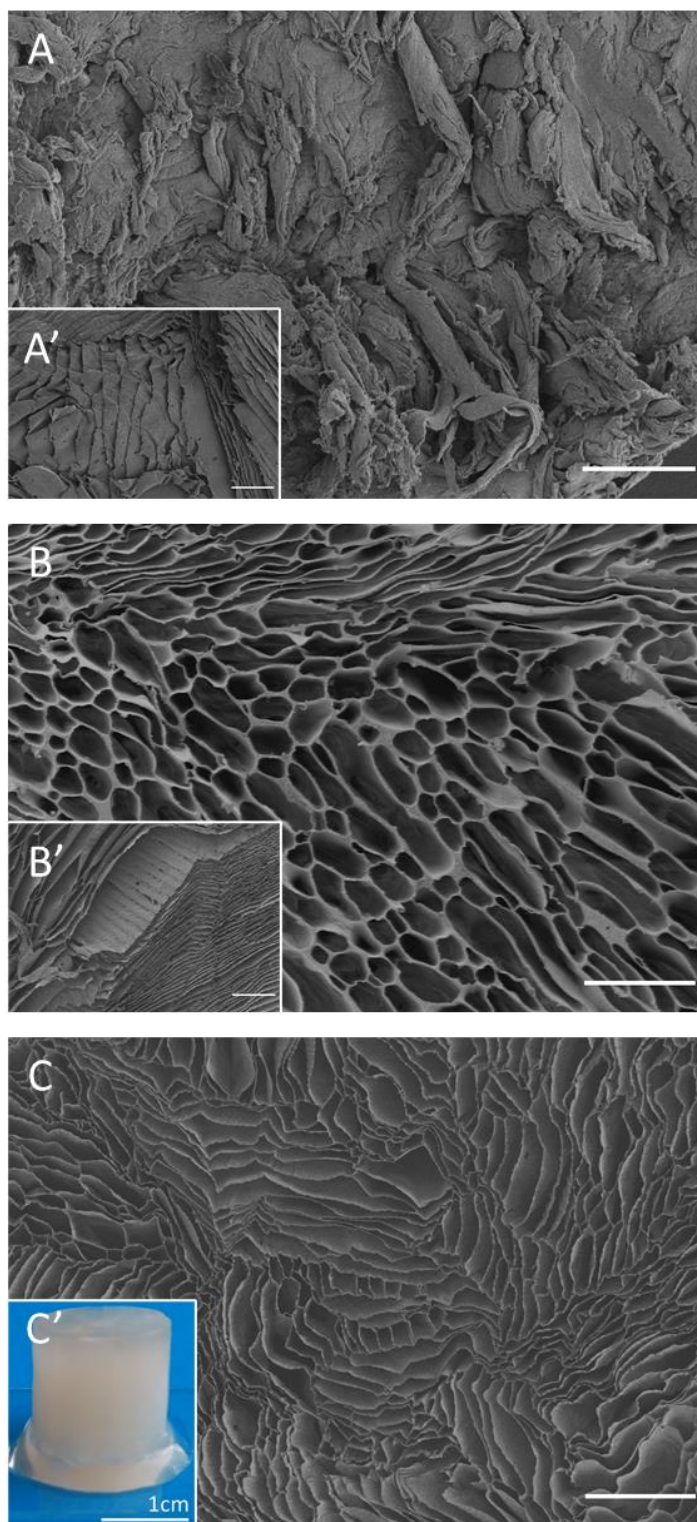
*Après leur élaboration, les hydrogels obtenus suivant les différents protocoles décrits auparavant ont été conservés dans de l'eau à  $4^\circ\text{C}$ . Ils ont ensuite été préparés pour les observations MEB par séchage supercritique. Pour cela des bains de déshydratation dans l'éthanol ont été réalisés – de 50% puis 75%, 90%, 96% puis deux fois 100% pendant 10 minutes chacun – puis le séchage est effectué. Pour cela 22 cycles d'échange sont réalisés avec du  $\text{CO}_2$  liquide sous haute pression (70 bar), avant de chauffer le réacteur pour induire le passage du  $\text{CO}_2$  en phase supercritique.*

*Pour permettre l'observation de la structure macroporeuse des matériaux, ainsi que pour caractériser les pores formés, les hydrogels séchés ont été découpés au scalpel, perpendiculairement à l'axe de croissance des cristaux de glace. Les tranches obtenues (d'une épaisseur de 3 à 4 mm) ont été recouvertes d'une couche de 20 nm d'or avant d'être observés au MEB.*

La Figure III-4 montre des clichés représentatifs des hydrogels obtenues pour chacune des différentes versions du procédé de réticulation topotactique mentionnées précédemment. Les clichés (A) et (A') illustrent la texture des hydrogels obtenus après 2 jours de stabilisation topotactique, par  $\text{CaCl}_2$ , dans un bain de glace. En (A), la perte de la structure macroporeuse obtenue lors de la congélation directionnelle est observable. En particulier, les pores semblent avoir collapsés suite à l'agrégation des parois adjacentes. Ces morphologies ne correspondent pas à celles observées au MEB pour les matrices lyophilisées. Cependant pour le cliché (A') la

matrice semble avoir conservé la morphologie organisée en parois et en pores (bien que les pores semblent s'être effondrés). Ces deux clichés ont été choisis pour mettre en évidence la grande variabilité des résultats obtenus par l'utilisation du bain de glace pour thermaliser le procédé de réticulation topotactique. En effet, la plupart des hydrogels obtenus via ce protocole perdent leur structure pendant qu'une minorité gardent partiellement la morphologie imposée par congélation directionnelle.

Ces rares hydrogels ayant conservé partiellement leur structure ont été encourageants et nous ont poussés à comprendre les phénomènes à la base de ces différences. Nous avons alors formulé l'hypothèse que ces deux morphologies obtenues seraient dues à l'instabilité de la température du bain de glace. La température de ce bain de glace est en effet variable et se réchauffe progressivement (observable par la fonte de la totalité des cristaux du bain de glace). Il ne permet pas une homogénéité thermique au sein même de la matrice et limite aussi la reproductibilité entre les différents échantillons. Lors du procédé de réticulation topotactique il y aurait une compétition entre la stabilisation par les agents de réticulation et la fonte des cristaux de glace qui solubiliserait alors les parois d'alginate encore non réticulées. Cette compétition se jouerait entre deux zones distinctes : une première qui n'est pas en contact avec la solution de réticulation – la glace pourrait recristalliser ou bien fondre à cause de la remontée de température. Et une deuxième zone où la glace serait en contact avec la solution de réticulation – la compétition serait alors dirigée par les cinétiques respectives de réticulation et de solubilisation de l'alginate des parois.



**Figure III-4:** Clichés MEB des matrices sèches obtenues après réticulation topotactique et séchage supercritique. En A et A', matrices après 2 jours dans 20 mL d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1M dans un bain de glace. Les clichés B et B' montrent les matrices réticulées (toujours par une solution de chlorure de calcium à 1M) dans un bain isotherme à  $-3^\circ\text{C}$ . En C et C', les matrices ont été réticulées dans un bain isotherme à  $-3^\circ\text{C}$  et les moules en polystyrènes dans lesquelles les solutions furent congelées ont été enlevées. Le cliché C' est une vue macroscopique d'un hydrogel structuré par congélation directionnelle puis stabilisées par réticulation topotactique. Toutes les matrices ont été élaborées à une vitesse de propagation du front de glace de  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Échelle : A et A'  $100 \mu\text{m}$ , B, B' et C  $200 \mu\text{m}$ .

Afin de s'attaquer à ces problèmes nous avons modifié le protocole comme décrit plutôt en échangeant le bain de glace par un bain thermostaté à  $-3^{\circ}\text{C}$ . Cette température a été choisie d'après la loi de Raoult (aussi appelé loi de Blagden en Équation III-1) permettant de calculer l'abaissement cryoscopique induite par un soluté :

$$\Delta T = k_c \cdot n \cdot i_{\text{CaCl}_2}$$

*Équation III-1*

Où  $\Delta T$  représente l'abaissement cryoscopique,  $k_c$  la constante cryoscopique de l'eau et est fixée à  $1,85^{\circ}\text{C} \cdot \text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $n$  la molalité du sel de  $\text{CaCl}_2$  (en  $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) et  $i_{\text{CaCl}_2}$  le facteur de Van't Hoff (coefficient de dissociation des ions) de 2,71 pour le  $\text{CaCl}_2$ . Ainsi pour une concentration de  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , l'abaissement cryoscopique est de  $5^{\circ}\text{C}$ . Nous avons pris en compte également la concentration finale des ions lorsque tout la glace aura fondu, les ions seront alors dilués dans environ 2 mL supplémentaires (les 2mL de glace formée lors du freeze-casting) ce qui diminuerait l'abaissement cryoscopique à  $4,58^{\circ}\text{C}$  (pour une utilisation de 20 mL de solution de réticulation). Ainsi en fixant la température du bain isotherme à  $-3^{\circ}\text{C}$ , la matrice resterait congelée, mais l'abaissement cryoscopique serait suffisant pour faire fondre les cristaux au contact de la solution de  $\text{CaCl}_2$ .

Après séchage supercritique, les hydrogels obtenus en fixant la température du bain isotherme à  $-3^{\circ}\text{C}$  ont conservé des pores et des parois. Les clichés MEB visibles en (B) et (B') de la Figure III-4 sont représentatifs des structures obtenues. Le cliché (B) – une vue du dessus perpendiculaire au gradient thermique appliqué lors de la congélation directionnelle – met en évidence de nombreux pores, ayant une largeur moyenne d'environ  $75 \mu\text{m}$  (moyenne du diamètre de Feret minimal). Cette valeur est supérieure (environ 3 fois plus grande) à celles obtenues pour les matrices lyophilisées après le freeze-casting. Le cliché (B') – une vue de côté, parallèle à la croissance des cristaux – met en évidence la conservation de l'anisotropie des pores observables en (B). À la différence des matrices stabilisées avec le bain de glace, les matrices obtenues via ce protocole thermalisé à l'aide d'un bain isotherme possèdent toute une structure analogue à celles présentées en (B) et (B') et ont conservé une structure macroporeuse anisotrope. La différence de variation de température au cours du procédé a alors bien eu un impact sur la structure finale obtenue, comme formulé dans une hypothèse précédente. En fixant la température du bain à  $-3^{\circ}\text{C}$ , la température de la matrice est donc restée en dessous de la température de fusion de la glace pure tout le long du procédé et a empêché la fonte inopportune des cristaux. Cependant, bien que la morphologie soit reconnaissable, les distances caractéristiques telles que la largeur des pores et l'épaisseur des parois sont, elles, clairement

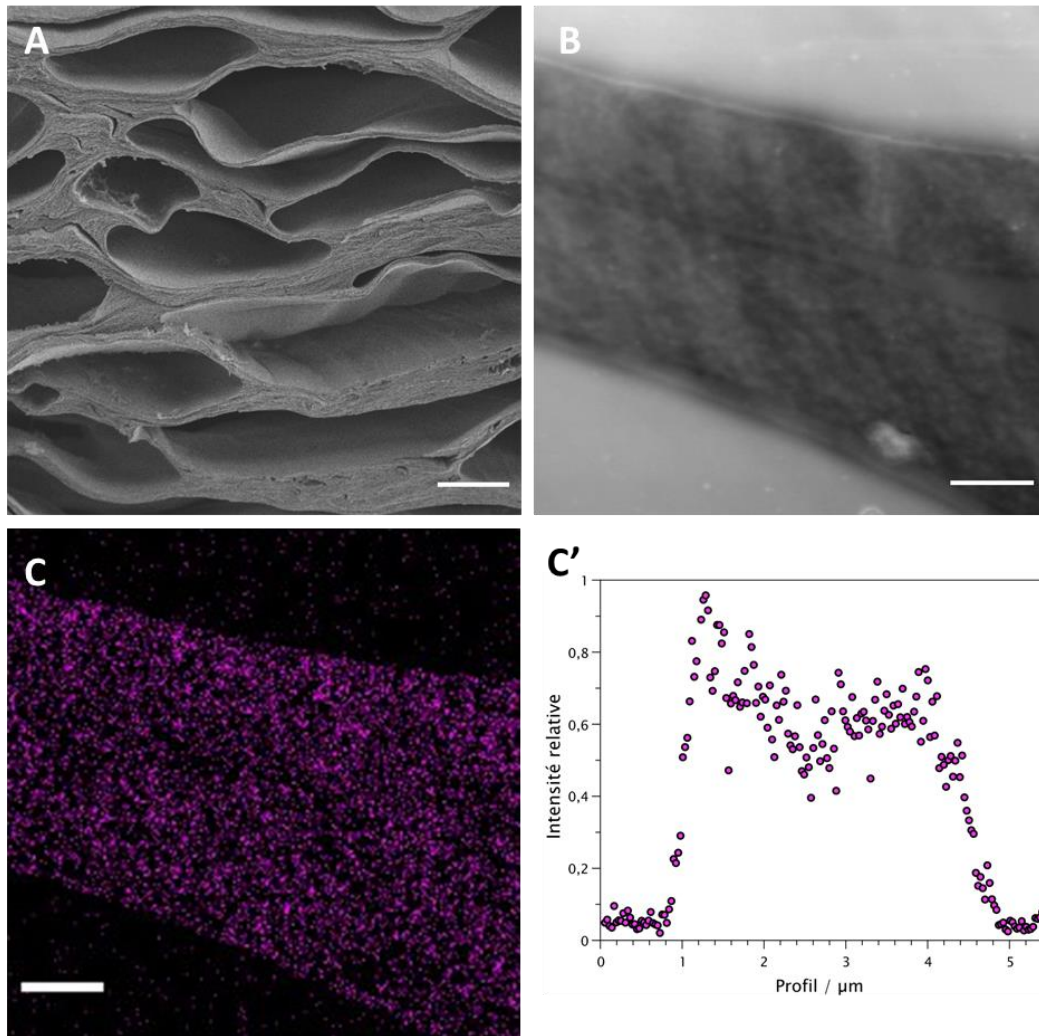
différentes de celles observées après freeze-casting. Les pores sont en moyenne 3 fois plus larges et la différence pour l'épaisseur des murs semble encore plus importante (non quantifiée). En analysant ces clichés, il semblerait que les murs observés soient composés de plusieurs murs collés ensemble, il est alors possibles certains pores aient disparu.

Nous nous sommes alors demandé si lors de la réticulation topotactique des phénomènes de recristallisation sont possibles. En effet, à  $-3^{\circ}\text{C}$  des réarrangements peuvent avoir lieux dans la glace et certains cristaux peuvent fondre et d'autres, au contraire, se développer. Ainsi, certains cristaux pourraient fondre libérant progressivement de l'espace que d'autres cristaux (formant les pores fins) s'approprieraient en grandissant. La disparition de certains cristaux pourrait décaler les parois d'alginate en les rapprochant et la fonte de ces cristaux pourrait de plus entraîner une solubilisation partielle des parois au contact, comblant alors l'espace entre les différentes parois concernées. Les murs observés semblant alors plus épais pourraient être composés de plusieurs parois d'alginate ayant fusionnées lors de la fonte et de la solubilisation partielle. Au contraire, les cristaux se développant pourraient écarter les parois et former des pores plus larges dans la matrice finale. Des analyses de clichés de microscopie électronique à transmission (MET) ont alors été réalisées afin d'appréhender cette possibilité et sont exposées en Figure III-5.

*Matériel et méthode : Observation MET d'hydrogels stabilisées par réticulation topotactique*  
Ces matrices ont été réalisées comme décrit au chapitre précédent avec une solution d'alginate de sodium à 4 wt% où 2 mL ont été congelées à une vitesse de  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  puis conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour la réticulation topotactique un bain isotherme de  $-3^{\circ}\text{C}$  a été utilisé avec comme agent réticulant 20 mL d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Au bout de 3 jours les matrices sont récupérées et lavées par 3 bains d'eau DI de 10 min. Les hydrogels sont fixés par du paraformaldéhyde et du glutaraldéhyde puis inclus dans une résine époxy (Le protocole de fixation est décrit en annexe).

Des coupes d'épaisseur comprises entre 50 et 80 nm sont alors réalisées sur un ultra microtome Leica UC7. Elles sont déposées sur des grilles de Cuivre de 300 mesh et elles sont contrastées à l'acétate d'uranyle 0,5% dans un mélange eau/EtOH (50/50). Ces coupes sont ensuite recouvertes de 5 nm de carbone par métaliseur avant d'être observées au MET (JEM 2011,  $V_{acc}=200 \text{ kV}$ ). Une cartographie élémentaire est réalisée par EDS (en collaboration avec la plateforme technique de la Fédération de Chimie et matériaux de Paris-Centre, FCMat) et les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Fiji.





**Figure III-5:** Clichés MEB et MET des aérogels obtenus par séchage des hydrogels stabilisés par réticulation topotactique dans un bain isotherme à  $-3^{\circ}\text{C}$ . (A) Cliché MEB d'une paroi d'alginate réticulée par le deuxième procédé de réticulation topotactique. (B) Cliché MET d'une paroi analysée par cartographie élémentaire dont les résultats sont présentés en (C). La densité des points violet représente la densité de calcium présent dans le mur. Cette répartition est ensuite quantifiée en (C') qui est une mesure de la densité de calcium dans la largeur du murs (normalisé). Echelle : (A)  $25\ \mu\text{m}$ , (B) et (C)  $2\ \mu\text{m}$ .

Sur le cliché MEB représenté en (A) de la Figure III-5, les parois les plus fines semblent s'associer pour former des parois plus épaisses. Contrairement aux clichés MEB des matrices structurées par congélation directionnelles puis lyophilisées, où tous les murs semblaient avoir une épaisseur similaire, ici il semble y avoir une forte dispersion dans la largeur des murs. Pour les clichés MET associés, où un mur à la fois est visible, des bandes fines dans la continuité des murs sont observées (B). Alors que la largeur des murs est comprise entre  $2\ \mu\text{m}$  et  $10\ \mu\text{m}$ , la largeur des bandes les composant est de la même dimension que celle mesurée après lyophilisation – entre  $0,5\ \mu\text{m}$  et  $1,5\ \mu\text{m}$ . De plus la cartographie élémentaire nous renseigne sur une disparité de la répartition du calcium dans les murs – en (C) et (C'). Les atomes de calcium

semblent en effet concentrés dans les structures fines des murs et en plus faibles quantités entre ces structures.

D'après ces observations il semblerait que les murs d'alginate obtenus avec ce protocole de réticulation topotactique soient composés de plusieurs murs formés lors de la congélation directionnelle qui se seraient agrégés ensemble. En effet, si nous reprenons l'hypothèse selon laquelle des recristallisations ont lieu avant l'arrivée des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , où certains cristaux de glace fondent pendant que d'autres grossissent, les murs auraient pu être en contact avec de l'eau liquide et auraient commencé à se solubiliser. Il est alors envisageable que la partie plus sombre des murs observée en microscopie électronique à transmission soit de l'alginate solubilisé extrait des parois (formées par freeze-casting) par le phénomène de recristallisation et ensuite stabilisés par les ions calcium de la réticulation topotactique. Cela pourrait de plus expliquer la répartition du calcium qui serait alors en plus grande quantité dans les parois initiales. Si l'on considère que le calcium est en excès et qu'une réticulation complète de tous les sites G des chaînes d'alginate ait lieu, la densité de calcium serait alors dépendant de la concentration d'alginate – il suffirait donc d'un ratio de  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{G}]$  de 0,55 pour que tous les sites G soient complexés<sup>272</sup>, ce qui correspondrait à une concentration d'environ 100 mmol.L<sup>-1</sup> dans notre cas (dans l'hypothèse théorique où les chaînes soient composées uniquement de groupement G). Ainsi les parties moins denses en  $\text{Ca}^{2+}$  seraient aussi moins dense en alginate. Ces parties du mur moins denses en  $\text{Ca}^{2+}$  correspondrait aux zones plus claires associées à la solubilisation d'une partie des parois initiales, elles-mêmes associables aux parties plus sombres et plus dense en  $\text{Ca}^{2+}$ .

Il est raisonnable de se demander si ce phénomène de recristallisation, qui semble impacter directement la composition des murs, ne pourrait pas avoir aussi un impact négatif sur la survie des bactéries alors encapsulés dans ces parois primaires. De plus, la diffusion des nutriments ainsi que l'efficacité de dépollution des bactéries encapsulées pourraient être réduites par cet épaissement des murs lors du regroupement des parois. Nous n'avons cependant pas poussé les analyses plus en avant car le dernier protocole de réticulation topotactique semblait plus prometteur, comme nous allons le voir.

Le dernier protocole de réticulation topotactique garde l'utilisation d'un bain thermostaté donnant des résultats encourageants. Les modifications introduites dans ce nouveau protocole visent à favoriser la réticulation de l'alginate au détriment de la solubilisation des parois due à la recristallisation de la glace. Les modifications apportées décrites en Figure III-3 reposent sur la pré-thermalisation des solutions de  $\text{CaCl}_2$  à  $-3^\circ\text{C}$  avant l'ajout des matrices. De plus, les tubes



de polystyrènes, servant de moules lors de l'étape de congélation directionnelle, sont retirés avant l'étape de réticulation afin d'améliorer la diffusion de la solution réticulante. Les résultats de ces changements sont exposés en (C) et (C') de la Figure III-4. La photo (C') représente un hydrogel structuré après un mois de stockage dans de l'eau. On peut alors remarquer la stabilité de l'hydrogel qui a conservé la forme cylindrique imposée par le tube en polystyrène (bien qu'il ait été enlevé) et dont les clichés MEB révèlent une structure présentée dans le cliché (C). On peut par ailleurs observer dans ce cliché MEB une morphologie identique à celle obtenue directement après congélation directionnelle (observations faites après lyophilisation), avec la présence de nombreux pores et parois d'alginate. De plus les dimensions des murs observées ici sont plus fines que celles du protocole précédent et sont comparables avec celles imposées par freeze-casting. Ainsi ce dernier protocole de réticulation topotactique semble permettre la stabilisation des matrices tout en conservant la structure poreuse et anisotrope, en une seule étape. De plus, nous en discuterons ultérieurement, les modifications ainsi apportées permettent de réduire le temps de réticulation, ce qui est intéressant d'un point de vue de l'optimisation du procédé mais peu aussi jouer un rôle important dans la survie des bactéries. Nous avons donc décidé d'analyser plus en détail les résultats obtenus par ce protocole tels que la structure, microstructure et la survie des bactéries.

## III.2 Caractérisation des matrices hydrogels sans bactéries

Comme nous venons de le voir, la morphologie des hydrogels réalisés par cette méthode finale de réticulation topotactique est très proche de celle obtenue directement après freeze-casting. Nous allons maintenant analyser plus en détail les dimensions caractéristiques des matériaux obtenus par ce processus.

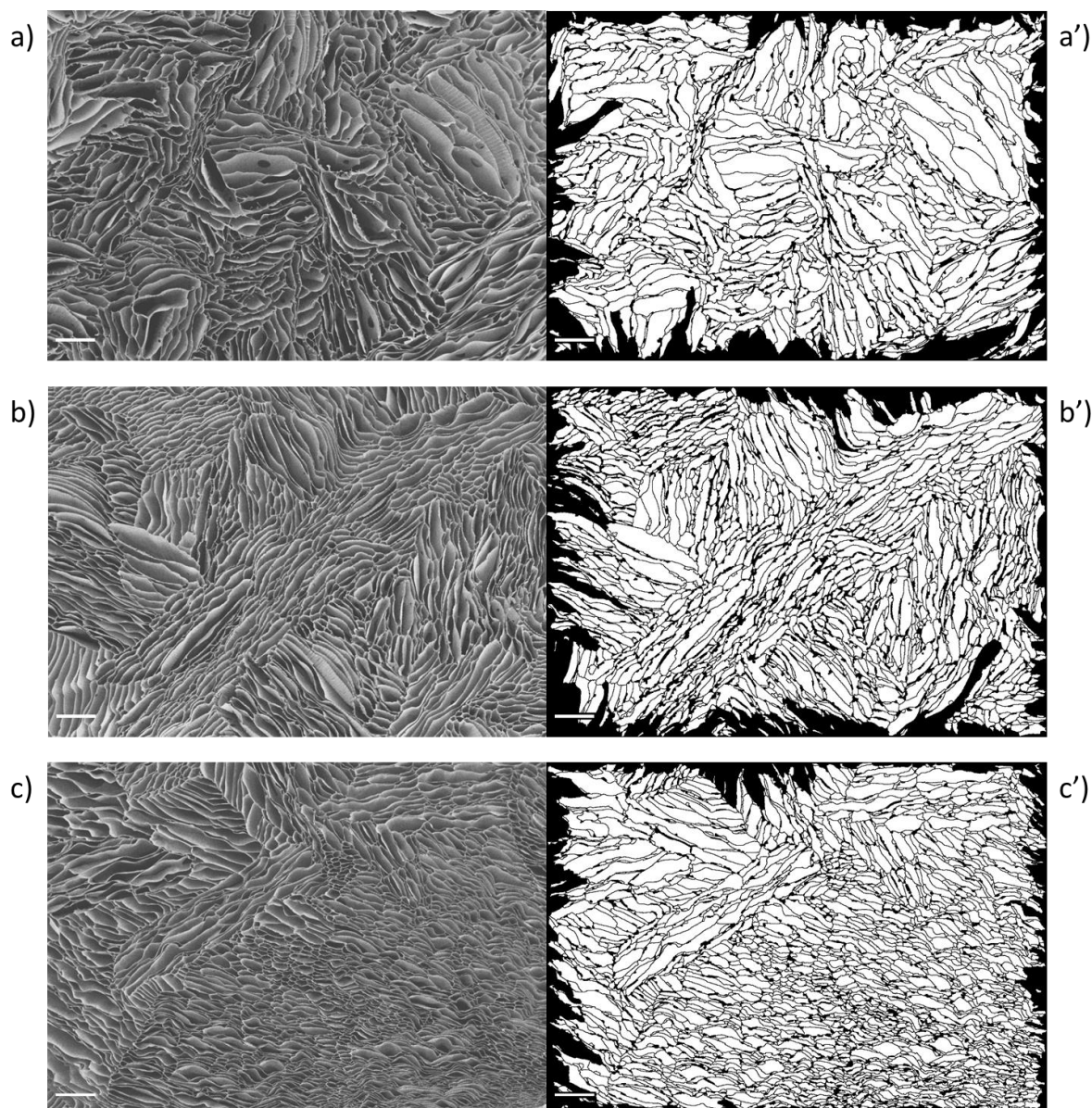
### *Matériel et méthode : Morphologie des hydrogels*

*Ces matrices ont été réalisées comme décrit au chapitre précédent avec une solution d'alginate de sodium à 4 wt% où 2 mL ont été congelés à des vitesses de 10, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  puis stockés à  $-80^\circ\text{C}$ .*

*Pour leur réticulation topotactique, des flacons de 50 mL sont préparés contenant 20 mL d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1M et refroidis à l'avance à  $-3^\circ\text{C}$ . Puis les moules en polystyrène sont enlevés à la pince coupante et les matrices congelées placées dans les solutions pré-refroidies. Ces ensembles sont ensuite transférés dans un bain isotherme à  $-3^\circ\text{C}$  et la réticulation topotactique se déroule alors pendant 3 jours.*

*Les hydrogels ainsi obtenus sont alors préparés pour les observations MEB par séchage supercritique. Ils sont d'abord découpés en deux dans l'axe de croissance des cristaux de glace, puis perpendiculairement en tranches d'environ  $3\pm 1$  mm au scalpel. Des bains de déshydratation dans l'éthanol sont réalisés – de 50% puis 75%, 90%, 96% puis deux fois 100% pendant 10 minutes chacun – puis le séchage est effectué. Pour cela 22 cycles d'échanges lent sont réalisés avec du CO<sub>2</sub> liquide sous haute pression.*

*Les hydrogels séchés sont ensuite recouverts d'une couche de 20 nm d'or avant d'être observés au MEB. Les clichés ainsi obtenus sont analysés à travers le logiciel Fiji. Le plugin MorpholibJ est utilisé pour délimiter les pores.*

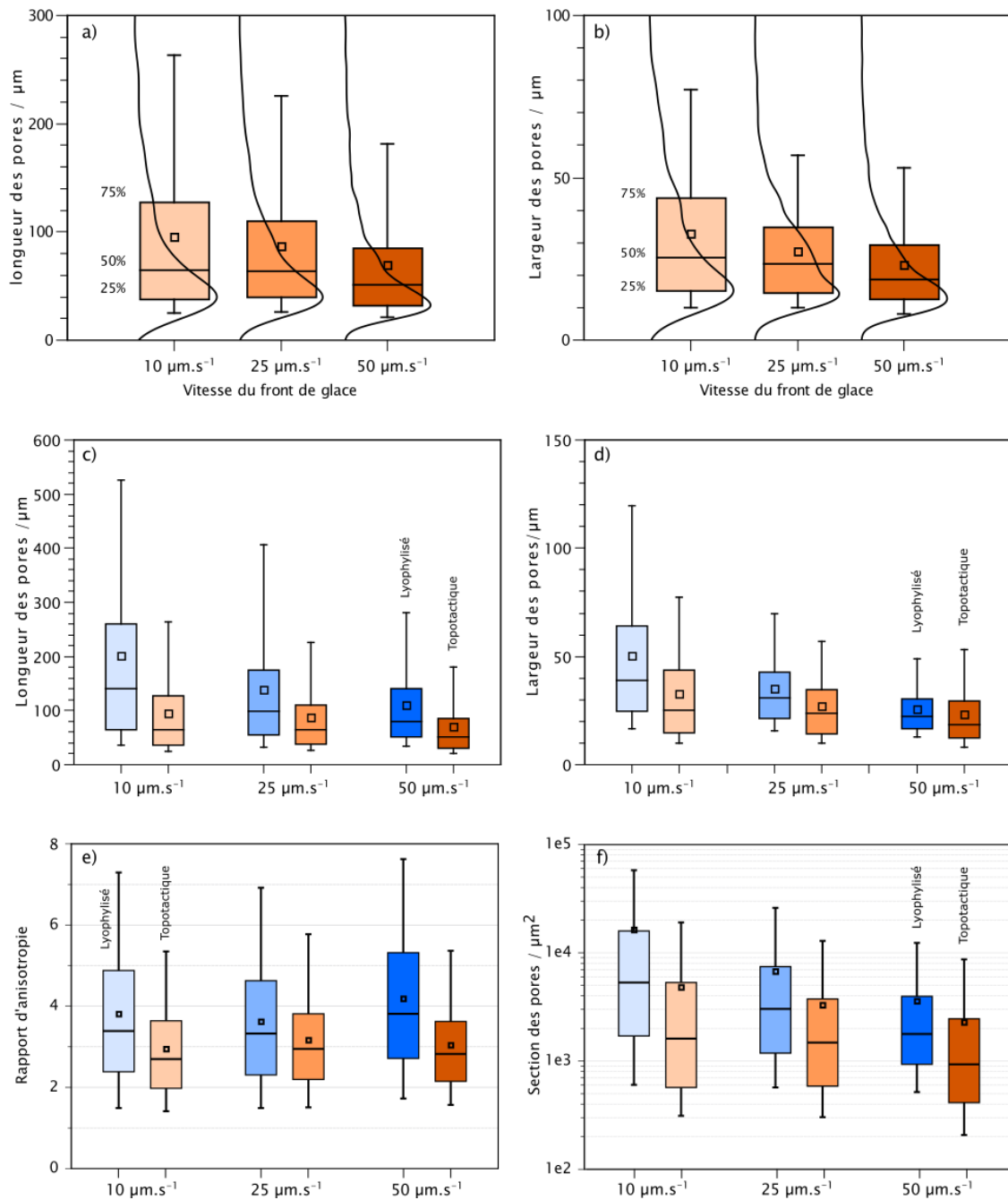


**Figure III-6:** Clichés MEB de coupes transversales des aérogels obtenus par séchage supercritique des hydrogels formés par congélation directionnelle puis stabilisés par réticulation topotactique. (a) Vue transversale d'une coupe d'hydrogel structuré à  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , (b) à  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , et (c) à  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les images (a'), (b') et (c') sont les masques représentant les pores quantifiés à l'aide du logiciel Fiji et du plugin MorpholibJ. Échelle :  $200 \mu\text{m}$  pour chaque cliché.

L'impact du nouveau procédé de réticulation topotactique sur la structure macroporeuse a été évalué sur des matrices obtenues par congélation directionnelle à différentes vitesses de progression de front de glace. Pour cela des solutions d'alginate à 4 wt% ont été structurées par freeze-casting avec une vitesse du front de glace de 10, 25 et  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Puis ces matrices ont été stabilisées par réticulation topotactique selon les conditions énoncées précédemment et préparées pour des analyses MEB.

Les clichés des coupes transversales sont utilisés pour les analyses de morphologie et les résultats sont présentés en Figure III-6. Ces clichés ont été analysés par le logiciel Fiji nous permettant de mesurer les tailles caractéristiques grâce aux masques réalisés – (a'), (b') et (c'). Ces analyses morphologiques sont détaillées dans la Figure III-7.

Les hydrogels présentés en Figure III-6 (séchés afin de rendre possible leur observation au MEB) possèdent de nombreux pores et parois comme observé dans le chapitre précédent pour les matrices lyophilisées. Une évolution dans la taille des pores inversement proportionnelle à la vitesse du front de glace est observable suite au nouveau procédé de réticulation topotactique. Cette évolution semble correspondre à celle caractérisée au chapitre précédent, où la taille des pores diminuait avec l'augmentation de la vitesse. Ces clichés semblent indiquer que le protocole de réticulation topotactique mis en place afin de stabiliser les matrices congelées permet de conserver la morphologie macroporeuse imposée par congélation directionnelle pour les différentes vitesses de front de glace utilisées. De plus les masques obtenus par l'utilisation du plugin MorpholibJ semblent correspondre de manière qualitative aux clichés analysés et les résultats de ces analyses sont présentés en Figure III-7.



**Figure III-7:** Évolution des tailles caractéristiques des pores des hydrogels après réticulation topotactique (en orange) et leur comparaison avec les matrices obtenues après congélation directionnelle et lyophilisation (en bleu). Les graphiques (a) et (b) représentent uniquement les données obtenues après la stabilisation topotactique. Avant et après réticulation topotactique la longueur (c) et la largeur (d) des pores diminuent avec l'augmentation de la vitesse. En (e) le rapport d'anisotropie (facteur de forme) est représenté, il est calculé en divisant la longueur des pores par leur largeur. En (f) la section des pores est représentée et semble diminuer avec l'augmentation de la vitesse dans les deux conditions évaluées.

Ces mesures, présentées en Figure III-7, montrent tout d'abord les résultats pour les tailles caractéristiques des pores des hydrogels séchés qui sont comparés dans un second temps avec celles de matrices lyophilisées directement après congélation directionnelles. Ces mesures

quantitatives confirment l'évolution des tailles caractéristiques des pores de manière inversement proportionnelle à la vitesse du front de glace – (a) et (b). Lorsque la comparaison est établie avec les matrices lyophilisées, des évolutions comparables sont retrouvées. Cependant, des différences sont observables avant et après l'étape de réticulation topotactique. En effet, les dimensions des pores mesurés après réticulation topotactique sont systématiquement inférieures à celle obtenues après lyophilisation. De plus le facteur de forme représenté en (e) montre une anisotropie plus forte pour les matrices lyophilisées que pour les hydrogels stabilisés – l'anisotropie selon l'axe de croissance des cristaux de glace ne peut pas être analysée à partir de ces clichés et l'anisotropie évoquée ici correspond au rapport entre largeur et longueur des pores et non leur hauteur. Il est aussi intéressant de noter l'invariance de ces facteurs de forme aux différentes vitesses utilisées. L'évolution de la section des pores (analogue à la section des cristaux qui ont fondu) est représentée en (f). Cette section diminue avec l'augmentation de la vitesse du front de glace (concordant avec les résultats du chapitre précédent où une vitesse supérieure diminuait la taille des cristaux) mais est systématiquement inférieure après la réticulation topotactique.

En résumé, le procédé de réticulation topotactique utilisé ici permet bien de conserver la morphologie définie par la congélation directionnelle, avec des structures et des tailles de pores comparables. Cependant, les matrices obtenues par l'utilisation de ce procédé de stabilisation topotactique en une seule étape semble avoir une morphologie de pores légèrement différente de celle observée après lyophilisation et sans réticulation. En effet, une diminution de la section des pores et de leur anisotropie est mesurée. Autrement dit, les pores semblent plus petits et arrondis. Ces différences peuvent être dues à plusieurs facteurs, il peut s'agir d'un artefact due au séchage supercritique faisant se contracter les matrices – cependant le changement d'anisotropie reste difficile à expliquer dans ce cas – ou bien d'une déformation due à la souplesse de l'hydrogel en solution afin de diminuer les tensions. L'eau pourrait en effet agir comme un plastifiant du réseau polymère d'alginate en induisant une relaxation des chaînes – en augmentant leur mobilité. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre ces différences. Cependant les résultats obtenus ici sont amplement suffisants en termes de conservation de la structure pour permettre l'utilisation du procédé de réticulation topotactique pour stabiliser les matrices cellularisées et structurées par congélation directionnelle.

Les caractérisations des hydrogels ont été poussées à une échelle plus fine, de l'ordre de grandeur des bactéries afin de sonder le microenvironnement auquel elles seront exposées. Des

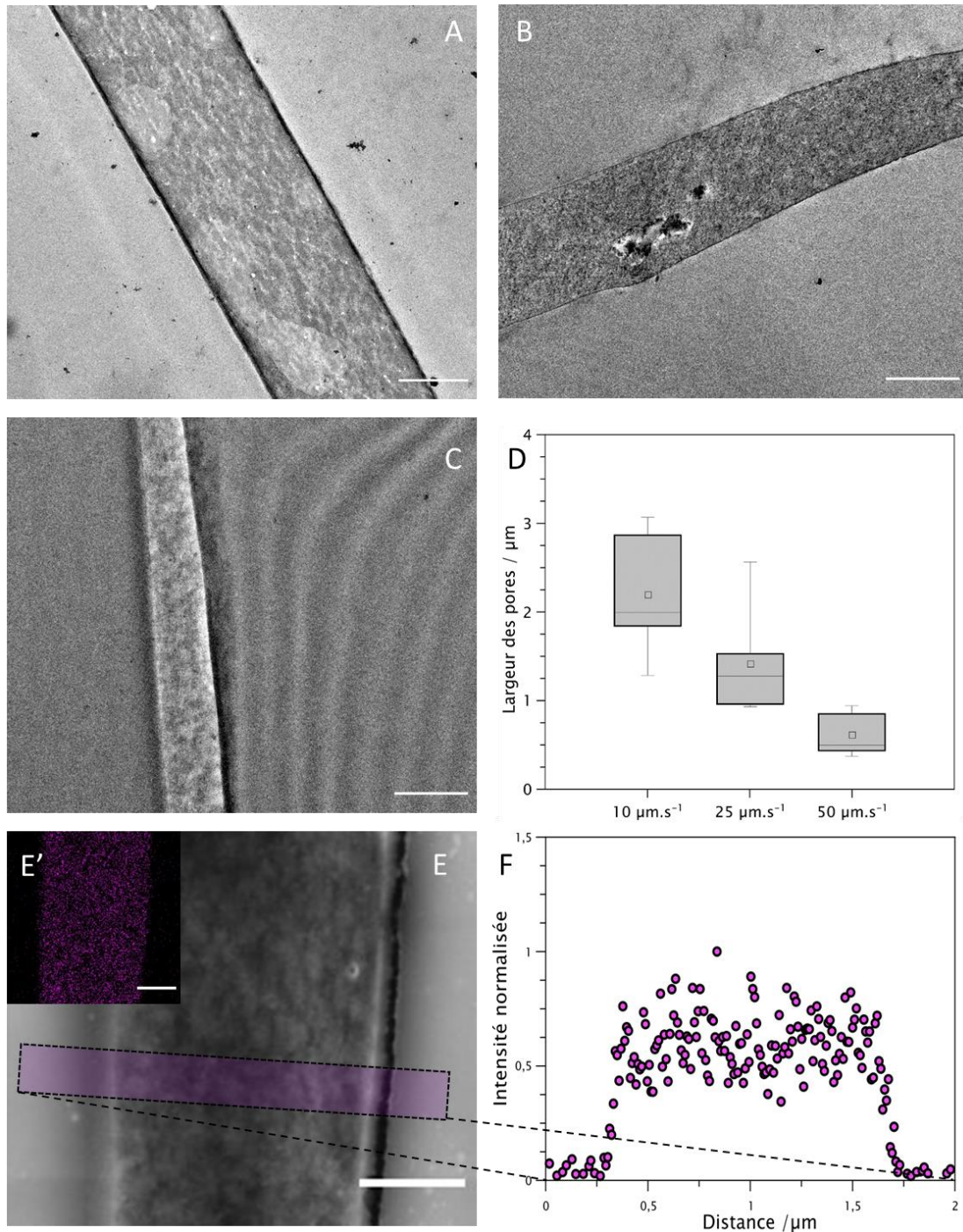
analyses de microscopie électronique à transmission ainsi que des mesures de cartographie élémentaires ont alors été réalisées.

*Matériel et méthode : Caractérisation MET des matrices stabilisées par réticulation topotactique*

*Des hydrogels structurés par congélation directionnelle et stabilisés par réticulation topotactique tel que précédemment présenté (pour les analyses MEB) sont réalisés à 10, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les hydrogels sont fixés par du paraformaldéhyde et du glutaraldéhyde puis inclus dans une résine époxy. Le protocole de fixation est détaillé en annexe.*

*Les coupes sont alors réalisées sur un ultra microtome Leica UC7. Elles font entre 50 et 80 nm d'épaisseur. Elles sont déposées sur des grilles de cuivre de 300 mesh et elles sont contrastées à l'acétate d'uranyle 0,5% dans EtOH 50%. Une couche de 5 nm de carbone est déposée par métaliseur et enfin l'observation au microscope électronique à transmission est réalisée. Une cartographie élémentaire est réalisée par EDS (en collaboration avec la plateforme technique de la Fédération de Chimie et matériaux de Paris-Centre FCMat) et les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Fiji.*





**Figure III-8:** Clichés de microscopie électronique à transmission des parois des hydrogels. Les clichés A, B, C et E ont été réalisés sur des échantillons congelés avec une vitesse de front de glace de 10, 25, 50 et  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$  respectivement. Des mesures d'épaisseur des murs sur plusieurs clichés permettent de tracer le graphe en (D). Une analyse élémentaire par EDX – d'un échantillon réalisé à  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$  – permet de cartographier la répartition du calcium (E') dans la largeur des murs (analyse du rectangle violet en E) qui est homogène (F). Échelle :  $1 \mu\text{m}$  de (A) à (D) et  $500 \text{ nm}$  pour (E) et (E').

Les observations MET présentées en Figure III-8 ont été réalisées sur des hydrogels structurés à différentes vitesses de front de glace – à 10, 25 et  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  – et stabilisés via le protocole de réticulation topotactique décrit précédemment. Pour les observations MET, ces



hydrogels ont été préparés par fixation (utilisation de paraformaldéhyde puis de glutaraldéhyde pour réticuler de manière covalente les matrices) puis ils ont été inclus en résine époxy afin de faciliter la découpe. Ces procédés sont possibles pour ces hydrogels car ils ont été stabilisés et rendus insolubles dans l'eau, cependant les tentatives d'appliquer cette même stratégie aux matrices lyophilisées ont échouées à cause de leur solubilisation pendant la réticulation au paraformaldéhyde, expliquant leur déstructuration. Des coupes fines d'une épaisseur de 50 à 80 nm ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome. Ainsi les parois des hydrogels, obtenues aux différentes vitesses, ont pu être observées individuellement et des analyses élémentaires ont été réalisées pour déterminer la répartition du calcium au sein des murs. La quantification de cette cartographie a été réalisée dans l'épaisseur des murs puis moyennée afin de voir la répartition du calcium à travers les parois.

Les clichés (A), (B) et (C) de la Figure III-8 montrent des segments de murs d'alginate réticulés à des vitesses de 10, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  respectivement. On peut tout d'abord noter l'apparence des parois qui, contrairement à celle des autres protocoles, semblent n'être composé que d'une partie hétérogène (les taches noires nanoscopiques ainsi que les zones claires sont des artefacts de l'agent de contraste, l'acétate d'uranyle, respectivement plus ou moins concentré). Les murs observés issus des protocoles précédents semblaient composés de plusieurs parois qui n'apparaissent pas ici. Les mesures de leur largeur sont présentées en (D) et diminuent lorsque la vitesse augmente, passant de 2,2 à 1,5 puis 0,8  $\mu\text{m}$  pour les vitesses de 10, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  respectivement. La cartographie élémentaire réalisée sur le mur en (E) – présentée en (E') – met en évidence la répartition du calcium dans la paroi observée. L'analyse de cette cartographie est montrée en (F) et présente une répartition homogène du calcium dans la largeur des parois.

Il est intéressant de noter la conservation de la différence des tailles caractéristiques pour les différentes vitesses de front de glace. En effet, comme attendu, plus la vitesse du front de glace est rapide lors de la congélation directionnelle et plus les pores sont petits et les murs fins. Le procédé de réticulation topotactique permet ainsi de conserver la vitesse du front de glace comme paramètre clef sur le contrôle de la morphologie des matrices. L'évolution du protocole de réticulation topotactique et son impact sur la morphologie des parois sont remarquables. En thermalisant les solutions réticulantes en amont et en enlevant les moules de polystyrène, la taille des murs a diminué drastiquement et traduit un changement dans la compétition entre la recristallisation et la réticulation. Les dimensions ainsi obtenues sont maintenant proches des tailles caractéristiques obtenues après lyophilisation. En comparaison avec les clichés MET

exposés en Figure III-5, les murs obtenus par le protocole final ne sont composés que d'une seule paroi, justifiant par ce fait la différence de largeur. La cartographie élémentaire confirme cette observation en montrant une répartition homogène du calcium dans les murs. L'épaisseur des parois obtenue par cette méthode est proche des dimensions caractéristiques des *Pseudomonas putida* et les problèmes liés à la diffusion des nutriments et des polluants au sein des murs pourrait alors être atténués (des études sur l'activité de l'eau et la diffusion des nutriments n'ont pas été réalisées et restent nécessaires). En reprenant les hypothèses évoquées plus tôt, les différences observées dans la structure des hydrogels à travers l'évolution du procédé de réticulation topotactique pourraient être dues à une modification de la compétition entre réticulation et solubilisation des murs – que cette solubilisation soit due à de la recristallisation ou bien à la fonte de la glace induite par l'abaissement cryoscopique. Les effets de la pré-thermalisation de la solution de chlorure de calcium n'ont pas été étudiés. Il est possible qu'elle puisse jouer un rôle dans la compétition précédemment évoquée en ralentissant la recristallisation dès le début du procédé, limitant ainsi la modification de la structure aux extrémités et impactant la diffusion. Le retrait du moule de polystyrène peut lui aussi avoir un impact sur la diffusion de la solution de réticulation. En effet en présence du tube de polystyrène, la diffusion de la solution réticulante est limitée et pénètre les matrices principalement par le haut et le bas – les côtés étant entourés par le moule. De plus la diffusion de cette solution par le bas de l'échantillon risque d'être limitée par le phénomène de surfusion décrit au chapitre précédent, formant alors une zone où la cristallisation – définissant la morphologie – n'est pas contrôlée. Le retrait de ce moule utilisé pendant la congélation directionnelle permet d'améliorer la diffusion des agents réticulants. Par conséquent, une diminution du temps nécessaire à l'étape de réticulation topotactique est observée, comme nous allons le voir.

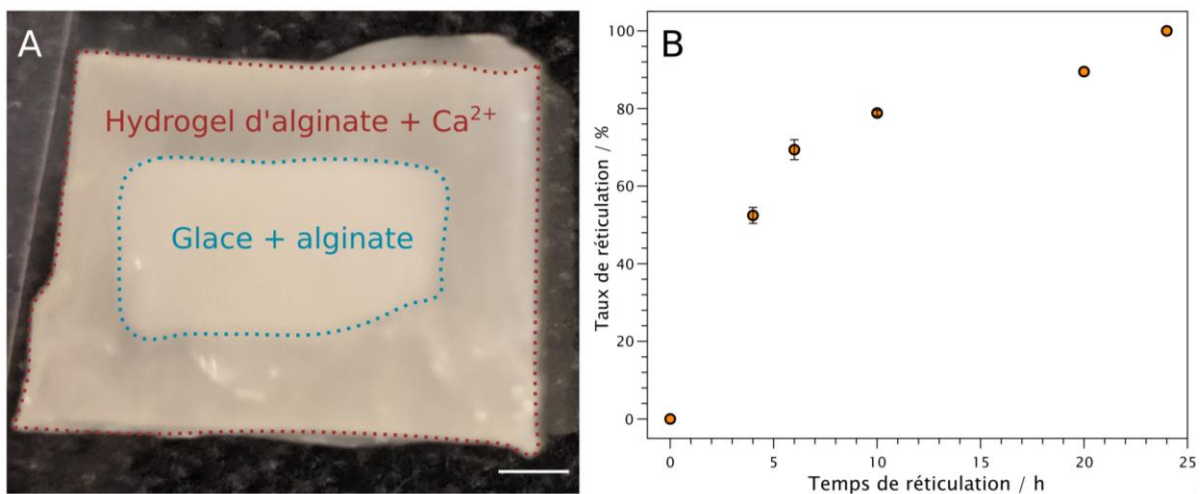
### **III.3 Étude cinétique de la réticulation topotactique**

Après avoir observé les améliorations obtenues après le retrait des moules de polystyrène, nous avons décidé de mesurer la vitesse de réticulation. Si le transport et la diffusion des ions calcium sont améliorés par le retrait du tube, il devrait s'ensuivre une diminution du temps de réticulation qui était jusqu'alors de 3 jours pour obtenir un hydrogel totalement stable.

*Matériel et méthode : Mesure macroscopique de la vitesse de réticulation topotactique*

*Des matrices à  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  sont réalisées (en triplicata) à partir d'une solution d'alginate à 4 wt%. Les matrices préparées ici ont en moyenne une hauteur d'environ 1,3 cm et d'un*

diamètre de 1,7 cm. Des solutions de réticulation de  $\text{CaCl}_2$  sont pré-refroidies à  $-3^\circ\text{C}$ . Les moules des matrices sont retirés à la pince coupante puis les matrices sont plongées dans les solutions de réticulation et dans le bain isotherme à  $-3^\circ\text{C}$ . Le procédé de réticulation est arrêté à différents temps (4h,6h,10h,20 et 24h) afin de mesurer l'avancement de la réticulation. Pour cela les matrices sont découpées en deux à la lame de rasoir et une photo est prise. Les surfaces des zones encore gelées et des zones réticulées sont alors mesurées à l'aide du logiciel Fiji pour calculer les volumes respectifs. Le rapport du volume réticulé par le volume total est alors représenté en Figure III-9.



**Figure III-9 :** (A) Coupe d'une matrice pendant l'étape de réticulation topotactique. Les pointillés rouges délimitent les contours de la partie réticulée de la matrice et les bleus de la zone encore congelée. Ces mesures permettent d'obtenir le graphe présenté en (B) représentant l'avancement de la réticulation. Cliché pris après 10 heures de réticulation. Échelle 2,5mm.

Des matrices congelées – structurées à une vitesse de front de glace de  $25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  – ont été réticulées topotactiquement et le procédé a été interrompu à différents temps afin de mesurer la vitesse de progression de la solution de réticulation. L'observation des coupes de ces matrices permet de différencier les parties réticulées et hydratées des zones encore congelées. La photo d'hydrogel présenté en (A) de la Figure III-9 permet d'identifier et de discriminer ces deux zones par leur apparence et propriétés mécaniques (ressenties lors de la coupe). D'apparence blanche et délimité par les pointillés bleu, le cœur de la matrice est encore congelé après 10 heures de réticulation topotactique. D'apparence grise et délimitée par les pointillés rouges, la partie la plus exposée à la solution de réticulation est stabilisée sous forme d'hydrogel et ne contient plus de cristaux de glace. En mesurant les surfaces ici observées et en utilisant les propriétés de symétrie des échantillons, le volume de chaque partie est calculé et comparé dans

le graphe (B). Le rapport des volumes de la partie réticulée sur la partie congelée est ici représenté en fonction du temps que ces échantillons ont passés dans le procédé de réticulation topotactique. Ces données montrent une augmentation du volume de la partie réticulée très rapide dans un premier temps et qui ralentie par la suite. Un point crucial des données recueillies est la réticulation complète des matrices au bout de 24 heures, pour les dimensions des matrices utilisés – 1,3 cm de diamètre et 1,7 cm de hauteur.

Cette expérience a montré que lors du procédé de réticulation topotactique les matrices sont bien stabilisées au contact de la solution de réticulation alors que le cœur, reste congelé. De plus, les modifications apportées au procédé permettent de diminuer drastiquement le temps de stabilisation en passant de 3 jours à 24 heures de réticulation.

Afin de confirmer le mécanisme de la réticulation topotactique, une étude microscopique du procédé a été réalisé *in situ*. L'observation en temps réel de la fonte des cristaux de glace et de la stabilisation des parois a été réalisée en collaboration avec le Dr. S. Deville à l'Institut Lumière Matière à Lyon. Le montage de microscopie confocale utilisé au chapitre précédent est repris ici et des modifications sont apportées. Ces expériences ont été réalisées en présence de bactéries de *Pseudomonas putida* afin d'appréhender leur devenir lors du processus de réticulation topotactique.

#### *Matériel et méthode : Analyse confocale de la réticulation topotactique*

*Le système de congélation directionnelle couplée au microscope confocal, utilisé pour observer in situ la croissance de la glace et la ségrégation de phase dans le chapitre précédent est réutilisé ici.*

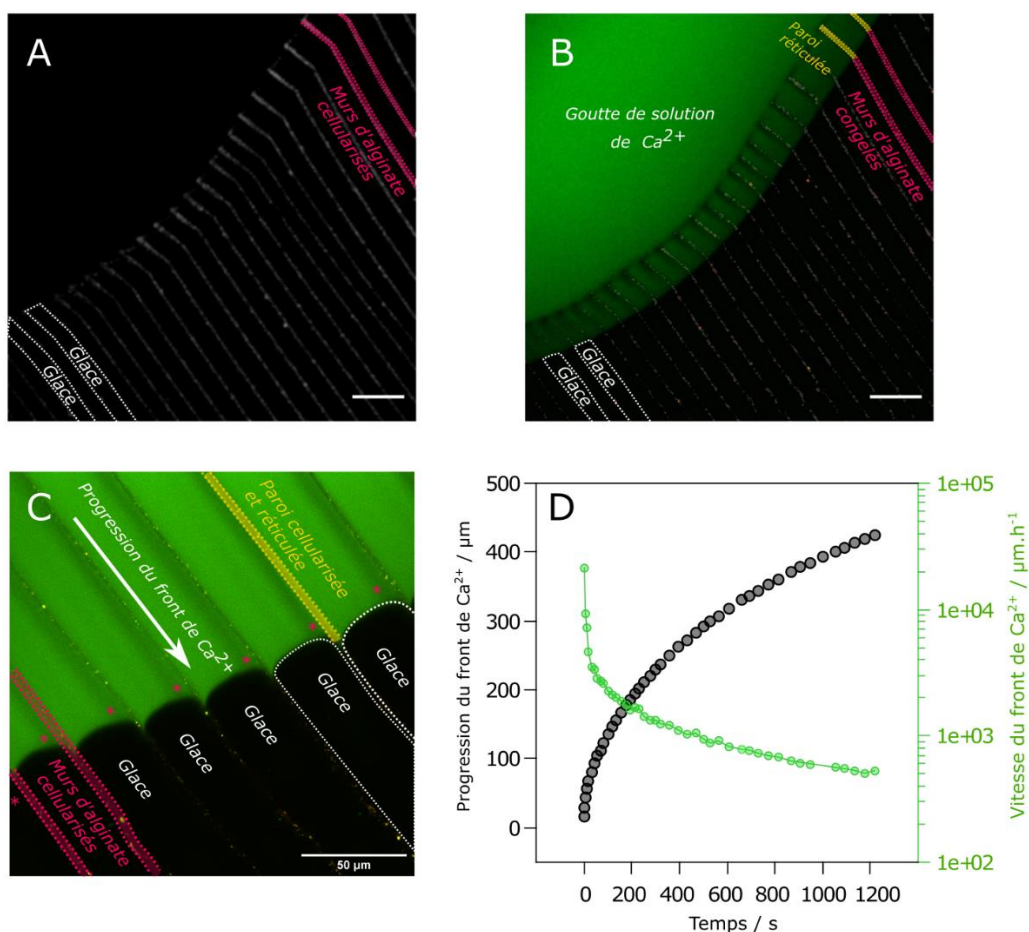
*Le système se compose de deux Peltiers indépendants contrôlés par le même élément ainsi que d'un contrôle de déplacement de l'échantillon en XY.*

*Les deux blocs thermiques sont séparés de 2 mm. Les observations ont été réalisés à travers un microscope confocal Laser Scanning Platform Leica TCS SP8 (Leica Microsystems SAS, Allemagne).*

*Une pré-culture de *Pseudomonas putida* mt2 (ATCC) est réalisée en mélangeant 100 µL d'aliquote de stockage à 14,9 mL de LB Broth et mis à incuber une nuit. Puis, pour la culture, on prélève 1,2 mL ajoute à 58,8 mL de LB Broth et mis à incuber pour 24 heures. Cette culture est ensuite séparée dans deux tubes de 30 mL et centrifugée à 3046 G pendant 10 min. Les culots obtenus sont redispersés dans un total de 30 mL d'une solution d'alginate à 4 wt%. Ces suspensions sont marquées en fluorescence par un test Live/Dead (SYTO:9/Iodure de Propidium) mettant en évidence les bactéries vivantes et mortes. Elles sont ensuite placées entre*

deux lamelles de verre (chambre Hele-Shaw) avec une épaisseur de 100  $\mu\text{m}$ . Ces échantillons sont déplacés depuis le Peltier chaud (12°C) vers le Peltiers froid (-10°C) à une vitesse linéaire de 25  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Une fois la suspension entièrement congelée, une solution de réticulation de chlorure de calcium à 1M contenant 2-3 ppm de rhodamine B (chromophore) est injectée entre les deux lamelles par une seringue reliée à un tuyau fin – le volume injecté est de l'ordre de la dizaine de microlitres. La solution de réticulation se propage par capillarité jusqu'à atteindre la goutte congelée d'alginate. Une acquisition séquentielle d'images permet de décrire la progression du front de calcium. Les données ainsi obtenues sont finalement analysées par le logiciel Fiji.



**Figure III-10:** Observation confocale et mesure de la réticulation topotactique. (A) Cliché de la fin de la congélation directionnelle où les cristaux de glace arrivent au bord de la goutte de suspension d'alginate et de bactéries, dont les parois sont visibles en gris et mis en évidence en pointillés rouges. Les cristaux de glace formés lors de la congélation directionnelle sont visibles en noir (délimité par des pointillés blancs). (B) Cliché du début de la réticulation topotactique avec en vert la solution de calcium marquée par de la rhodamine B. Les lignes délimitées par les pointillés jaunes sont les parois stabilisées par la réticulation topotactique. (C) Cliché rapproché de la réticulation topotactique avec, mises en évidence, les parois stabilisées par le calcium en jaune (D). Les points noirs sont les mesures

*de l'avancement du front de calcium au cours du temps à partir de la surface de l'échantillon, et en vert la vitesse instantanée de ce même front. Échelles : (B) 100µm (C)50µm.*

Les résultats des expériences, permettant de mesurer le retrait de la glace lors de la réticulation topotactique sous le microscope confocale, sont exposés en Figure III-10. Le premier cliché (A) montre l'extrémité d'un échantillon à la fin de l'étape de congélation, les murs entre les cristaux sont visibles à travers les bactéries marquées par les chromophores du kit live/dead. Comme vu dans le chapitre précédent, la quasi-totalité des bactéries se retrouvent encapsulées lors de la ségrégation de phase entre les cristaux de glace et les zones riches en alginate. L'observation des bactéries peut donc être corrélée avec la localisation des parois d'alginate. Le second cliché (B) montre l'arrivée de la solution de réticulation (en vert) ainsi que le début de la réticulation topotactique, avec les parois stabilisées en jaune. Un grandissement supérieur est utilisé pour le cliché suivant (C) où l'interface entre la solution de réticulation et la partie encore congelée de l'échantillon est observée. La progression de la solution peut être suivie en même temps que la disparition des cristaux de glace. On observe la conservation de l'organisation des parois après le passage de la solution de calcium, comme attendu d'après les résultats MEB. Il est aussi intéressant de noter que la progression du signal de la rhodamine se fait parallèlement à la surface de l'échantillon formant un front de progression de la solution de réticulation. Les analyses de la position et de la vitesse de progression de ce front de calcium sont représentées dans le diagramme en (D). Cette vitesse décroît en progressant dans la matrice et atteint une valeur de  $600 \mu\text{m.h}^{-1}$  au bout de 20 min.

La vitesse d'avancement du front de réticulation mesurée est globalement dans l'ordre de grandeur attendue. En considérant que la vitesse de  $600 \mu\text{m.h}^{-1}$  se maintient le long de la réticulation, elle permettrait de réticuler une matrice de 14,4 mm en 24 heures. Si l'on prend en compte la décroissance de cette vitesse mais aussi le fait que la matrice soit réticulée de chaque côté, l'évolution de la vitesse mesurée correspond de manière satisfaisante aux mesures macroscopiques. Ainsi cette expérience peut être utilisée comme modèle satisfaisant pour visualiser microscopiquement la réticulation topotactique.

On observe alors simultanément la fonte des cristaux de glace et la stabilisation des parois qui conservent leur morphologie imposée par ces mêmes cristaux. Il est important de noter ici que les murs d'alginate ne sont pas observables directement (le polymère n'est pas fonctionnalisé par un fluorophore), en effet comme mentionné plutôt, ce sont les bactéries qui sont marquées par un fluorophore. Ainsi après le passage du front de calcium, les bactéries restent situées dans la structure imposée par la congélation directionnelle – encapsulées dans

l'alginate réticulé. On peut alors dire que lors du procédé de réticulation topotactique, il n'y a pas de relargage de bactéries vers les pores formés lors de la fonte des cristaux de glace, et qu'elles restent donc encapsulées dans les murs réticulés. Les rares bactéries qui auraient été piégées directement dans les cristaux de glace seraient mortes et ne sont pas prises en compte dans cette discussion. Ainsi, si une différence de viabilité est observée après réticulation topotactique, il ne s'agira pas d'une perte de bactéries par relargage.

L'utilisation de deux marqueurs fluorescents pour différencier *in situ* les bactéries ayant conservé leur membrane intacte de celles endommagées n'a pas été concluant. En effet, pour suivre la survie des bactéries les fluorophores doivent être présents lors de la réticulation topotactique mais l'excès de ces molécules en solution ne permet pas de quantifier les proportions de bactéries mortes ou vivantes. Cette méthode de marquage est statique, et sert à décrire un état des membranes à un moment donné et n'est pas adaptée à la cinétique de l'expérience. Cette méthode est utilisée le plus couramment sur des échantillons préalablement fixés avec un temps d'incubation puis une étape de lavage qui n'est pas réalisable dans cette expérience. Ainsi, bien que le marquage soit utile pour suivre la position des bactéries, cette technique ne peut pas être utilisée pour quantifier la survie des bactéries dans notre expérience.

Cependant le comptage en boîte de Petri reste un outil adapté pour quantifier la survie des bactéries. Des expériences de mesure de la survie ont alors été réalisées au laboratoire pour mesurer l'impact de ce nouveau procédé, qui permet de former un hydrogel en conservant la structure imposée par freeze-casting, sur la viabilité des bactéries.

### **III.4 Viabilité des bactéries encapsulées dans des matrices stabilisées par réticulation topotactique**

La réticulation topotactique a été mise en place afin de diminuer le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention d'hydrogels cellularisés et structurés. L'hypothèse sous-jacente était que le remplacement des deux étapes de lyophilisation suivie d'une réticulation – critique pour la viabilité – par une seule étape adaptée de la fibrillogenèse topotactique, permettrait une amélioration de la survie des bactéries encapsulées. Pour vérifier cette hypothèse motrice de la réticulation topotactique, la survie des bactéries *Pseudomonas putida* a été évaluée après leur encapsulation par congélation directionnelle et comparée à l'étape de réticulation topotactique. Différentes concentrations sont testées ainsi que les deux vitesses les plus prometteuses, 25 et 50  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .



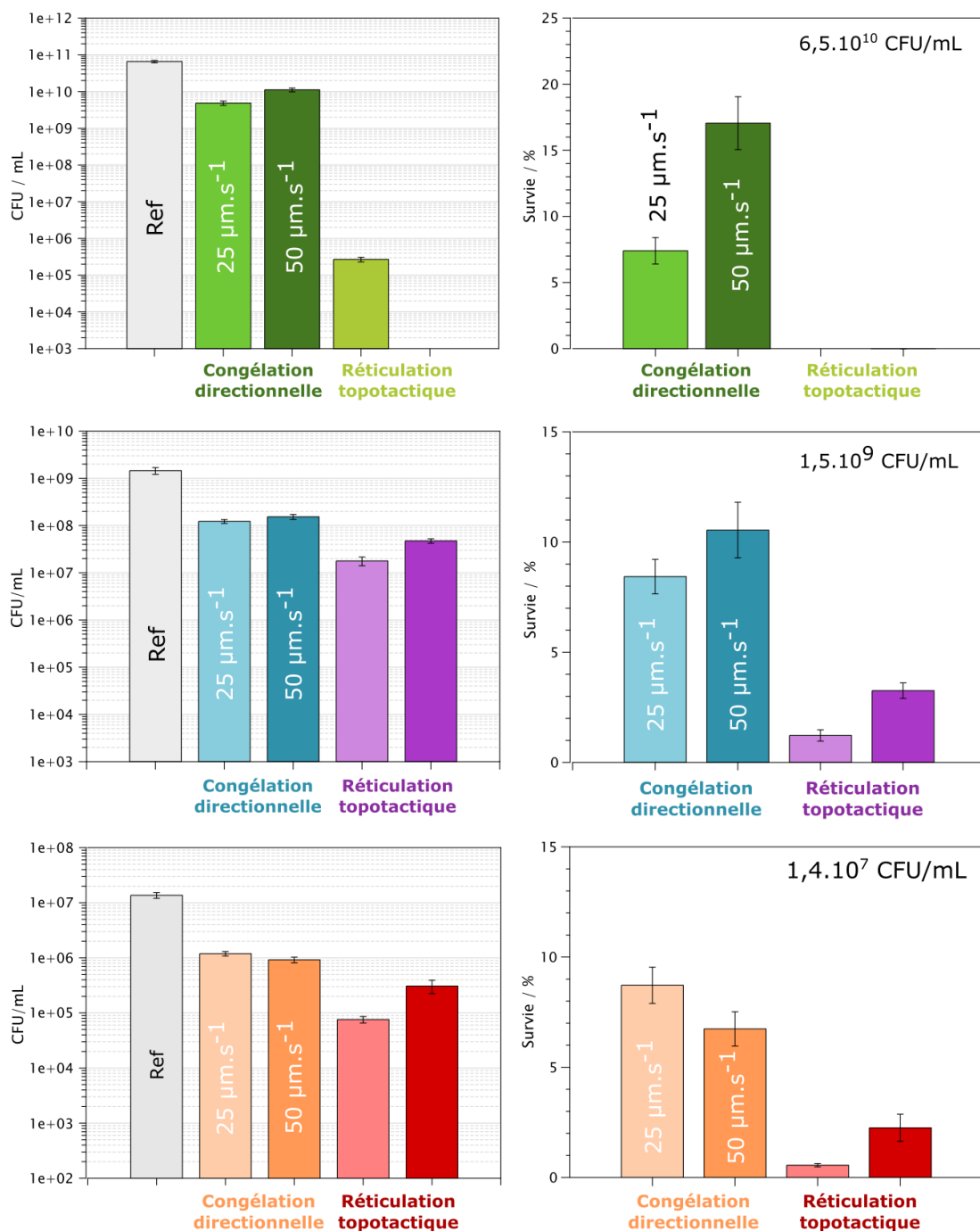
### *Matériel et méthode : Survie des bactéries encapsulées après réticulation topotactique*

*Une préculture de P. putida est réalisée en mélangeant 100 µL d'aliquote conservés à -80°C avec 14,9 mL d'une solution de culture de LB Broth (ref). Après une nuit à l'incubateur (35°C et agitation de 150 RPM) 1,2 mL de la préculture sont ajoutés à 58,8 mL de la solution de culture LB Broth et remis à incuber pour une nuit. Les 60 mL de suspension de bactéries ainsi obtenue sont séparés en 2 tubes de 30 mL et centrifugés à 3046 G dans une centrifugeuse pendant 10 min. Les culots sont ensuite dispersés dans 30 mL d'une solution d'alginate à 4 wt% et utilisé directement pour l'encapsulation. La suspension de P. putida dans la solution d'alginate obtenue (concentration initiale de l'ordre de grandeur de 10<sup>9</sup> CFU/mL) est ensuite utilisée pour l'encapsulation. Afin de mesurer cette référence, un comptage de colonie en boîte de Petri est réalisé.*

*Les matrices cellularisées sont alors formées par congélation directionnelle : 2 mL de la suspension de bactéries et d'alginate sont versés dans le tube en polystyrène situé au sommet de la tige en aluminium plongeant dans l'azote liquide. Des vitesses de progression de front de glace de 25 et 50 µm.s<sup>-1</sup> sont appliquées. Six matrices de chaque vitesse de front de glace sont réalisées afin de mesurer la viabilité en triplicata après l'étape de congélation puis après l'étape de réticulation topotactique. Les matrices ainsi obtenues sont stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour mesurer la survie des bactéries après l'étape de freeze-casting les matrices sont décongelées dans 20 mL d'eau stérile à 30°C pendant 10 min. Après 10 min de centrifugation, les culots sont redispersés dans 10 mL d'eau déionisée et stérile. Les dilutions et l'étalage en boîte de Petri permettent alors de compter le nombre de bactéries ayant survécu au processus de congélation directionnelle.*

*Les matrices restantes sont réticulées dans 20 mL d'une solution de chlorure de calcium à 1M. Pour cela les solutions sont pré-refroidies et les tubes de polystyrène sont enlevés puis les matrices sont plongées dans les solutions dans un bain thermostaté à -3°C pendant 24 heures. Une fois la réticulation terminée les matrices sont découpées au scalpel (lames stérilisées et sous post de sécurité microbiologique) et le calcium résiduel est enlevé par 3 bains d'eau DI successifs de 5 min. Enfin les morceaux de matrices sont dispersés dans une solution de déstructuration de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/acide citrique (respectivement à 0,05M et 0,02M) pendant 30 min sous agitation. Finalement après centrifugation de 10 min, les culots sont redispersés dans 10 mL d'eau déionisée et stérile. Des dilutions et un comptage sur boîte de Pétri sont réalisés.*





**Figure III-11:** Mesure de la viabilité des bactéries encapsulées après l'étape de freeze-casting et après l'étape de réticulation topotactique à différentes concentrations. La survie en fonction des vitesses de front de glace de 25 et 50 μm.s<sup>-1</sup> sont présentés à gauche en valeur absolue et à droite en pourcentage par rapport à la concentration de la suspension initiale. Les trois lignes des graphes représentent chacune une concentration initiale de bactéries différente (6,5.10<sup>10</sup>, 1,5.10<sup>9</sup> et 1,4.10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> respectivement).

La mesure de l'impact du procédé de réticulation topotactique sur la viabilité des bactéries est une étape importante car elle détermine les conditions à utiliser pour effectuer les expériences de dépollution dans le cadre de cette thèse.

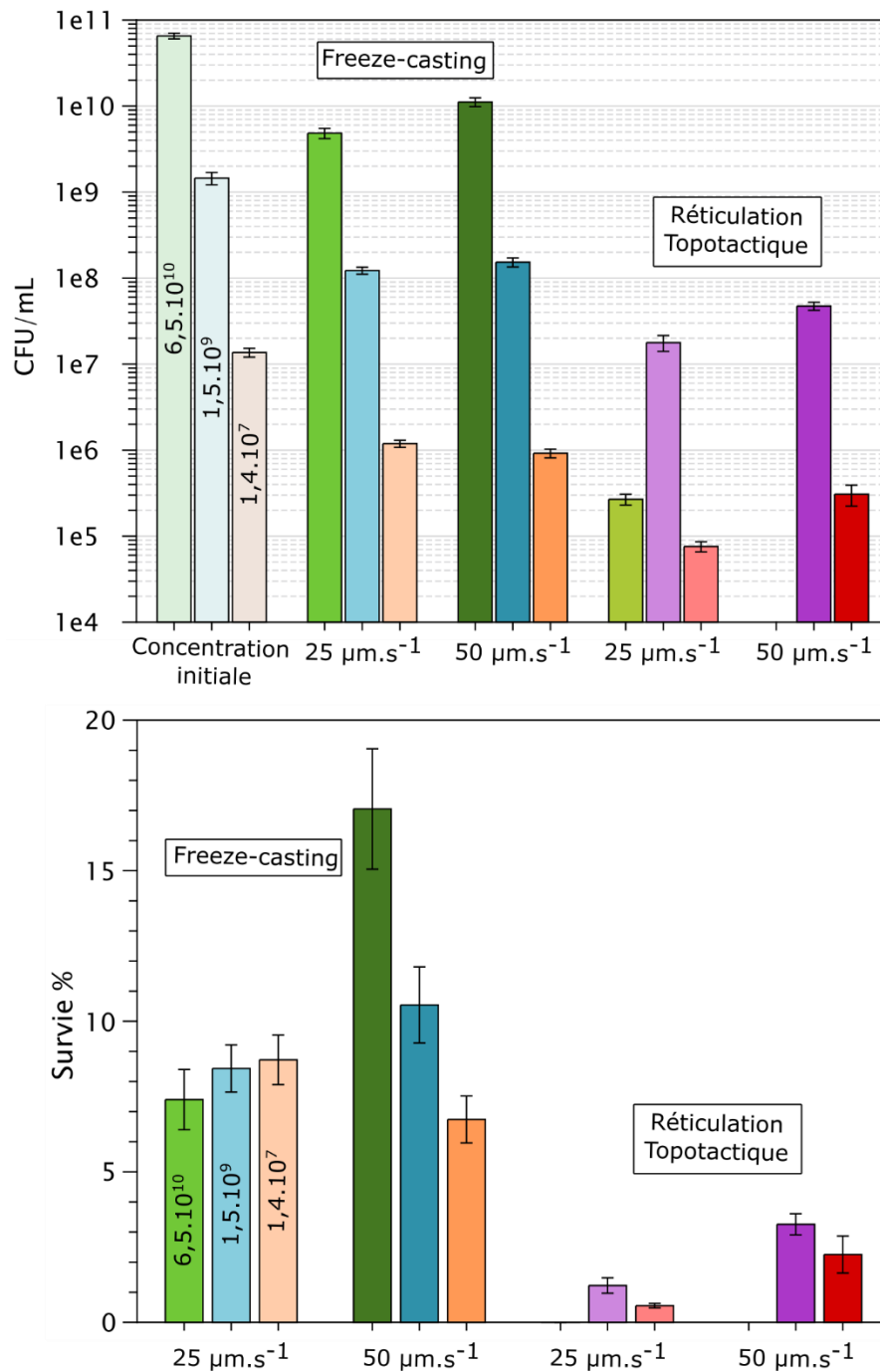
Pour mesurer la survie des bactéries après leur stabilisation topotactique, trois concentrations initiales ont été utilisées :  $6,5 \cdot 10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup>,  $1,5 \cdot 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> et  $1,4 \cdot 10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Deux vitesses de front de glace imposées lors de l'étape de congélation directionnelle ont été choisies : 25 et 50  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Celle de 10  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  n'a pas été analysée ici car les résultats de viabilité sont constamment inférieurs aux autres vitesses et surtout, le temps de congélation est ici bien supérieur et limite le nombre de conditions analysables si des triplicatas sont réalisés.

L'obtention des mesures de viabilité des *Pseudomonas putida* encapsulées après congélation directionnelle est décrite au chapitre précédent. Les matrices structurées et congelées sont stabilisées par le processus de réticulation topotactique pendant 24 heures. Ces hydrogels sont ensuite déstructurés par la solution précédemment utilisée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/AC permettant la chélation des ions calcium tout en conservant la viabilité des bactéries. Leur survie est alors mesurée par comptage en boîte de Pétri.

L'impact de l'étape de congélation directionnelle sur la viabilité des bactéries ayant déjà été traité au chapitre précédent nous nous focaliserons sur celui de l'étape de la réticulation topotactique. Pour la concentration initiale de  $6,5 \cdot 10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup> on peut tout d'abord observer une perte importante de viabilité après l'étape de réticulation topotactique. En effet, une perte de 4 ordres de grandeur pour une vitesse de front de glace de 25  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  est mesurée et aucune colonie n'a été observée lors du comptage des matrices structurées à une vitesse de 50  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (le nombre de bactéries viables est alors sous le seuil de détection de ces comptages avec une perte supérieure à 4 log). Cependant pour les concentrations initiales inférieures, la concentration ne diminue que d'un ordre de grandeur. On peut aussi remarquer l'inversion de viabilité après réticulation topotactique qui a lieu pour la concentration initiale de  $1,4 \cdot 10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> en fonction de la vitesse du front de glace. En effet, après freeze-casting la vitesse de 25  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  donne de meilleurs résultats que celle de 50  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  alors qu'après réticulation topotactique, la vitesse de 50  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  affiche une viabilité supérieure.

Ainsi la viabilité finale après l'obtention d'un hydrogel fonctionnel est de l'ordre des centièmes. La conservation de la viabilité via ce procédé de réticulation topotactique en une étape donne de meilleurs résultats que l'obtention d'hydrogel cellularisé en utilisant une étape intermédiaire de lyophilisation tel que présenté en début de chapitre.

Ces résultats ont été regroupés dans des graphes présentes en Figure III-12 afin d'en avoir une meilleure préhension.



**Figure III-12:** Résumé de la viabilité bactérienne après chaque étape, en fonction de la vitesse et de la concentration initiale. Dans un premier temps le nombre de bactérie par millilitre de solution de déstructuration est représenté puis, dans un second temps, la viabilité relative à la concentration initialement congelée.

La Figure III-12 permet de comparer l'impact des concentration initiales des bactéries sur leur survie aux différentes étapes et vitesses de progression du front de glace. L'utilisation de graphiques en pourcentages permet une comparaison des taux de survie entre les différentes concentrations de bactéries initiales.

Pour la vitesse de front de glace de  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$ , les taux de viabilité varient peu en fonction des concentrations initiales après freeze-casting, contrairement à la vitesse de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  où les taux de survie varient significativement (comme évoqué au chapitre précédent). Cependant après réticulation topotactique seules les concentrations inférieures à  $10^{10} \text{CFU.mL}^{-1}$  ont des résultats satisfaisants. La conservation de la viabilité est en effet de l'ordre du pourcent, et est meilleur pour la vitesse de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  ainsi que pour la concentration de  $1,5.10^9 \text{CFU.mL}^{-1}$ .

La représentation de la viabilité des bactéries à l'aide de leur concentration met en évidence la différence de concentration finale de bactéries encapsulées dans les hydrogels. En effet, la concentration finale des bactéries pour la concentration initiale de  $1,4.10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  est d'environ  $8.10^4 \text{CFU.mL}^{-1}$  et de  $3.10^5 \text{CFU.mL}^{-1}$  pour les vitesses de  $25$  et  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  respectivement. Pour la concentration initiale de  $1,5.10^9 \text{CFU.mL}^{-1}$ , elles sont d'environ  $2.10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  et de  $5.10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  respectivement. Au vu de la concentration finale environ 100 fois plus importante, on peut s'attendre à une efficacité plus élevée pour la dépollution avec l'utilisation des hydrogels formés à partir de la concentration de  $1,5.10^9 \text{CFU.mL}^{-1}$ . Ces attentes sont évidemment à confirmer lors d'expériences de dépollution.

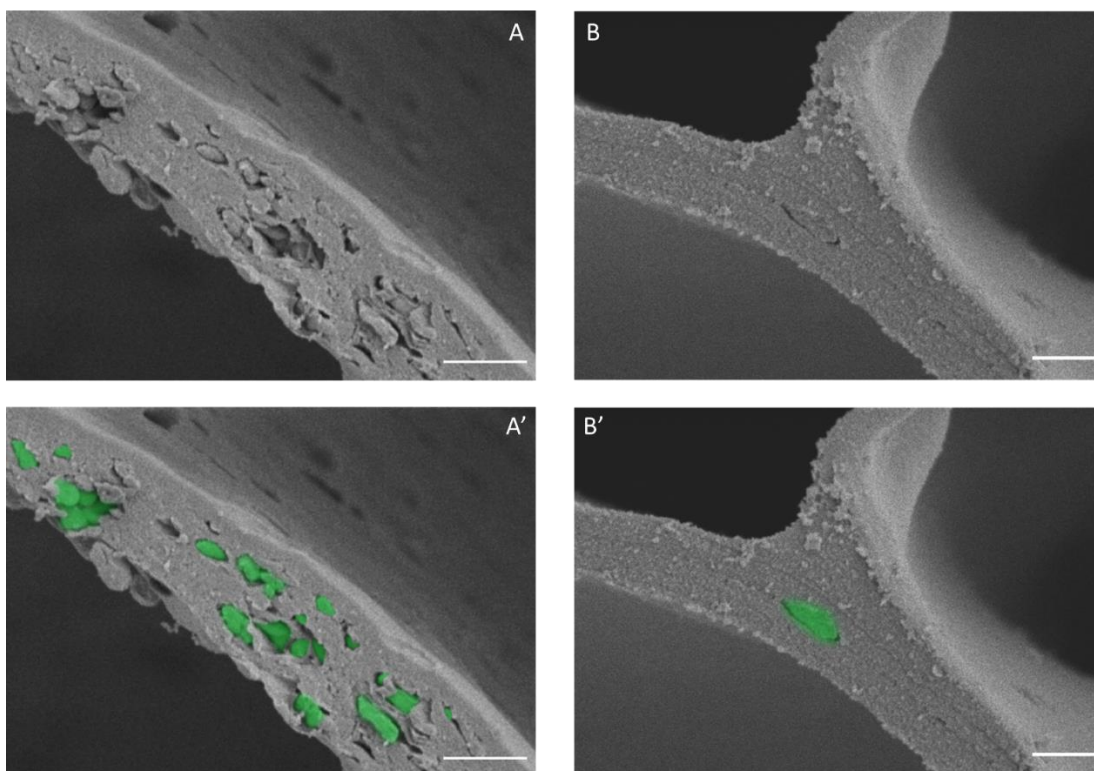
Des clichés MEB ont été réalisés aux concentrations de  $6,5.10^{10} \text{CFU.mL}^{-1}$  et de  $1.10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  afin de visualiser la différence de répartition des bactéries dans ces matrices.

#### *Matériel et méthode : Observation MEB de bactéries encapsulées*

*Deux suspensions de Pseudomonas putida dans de l'alginate à 4 wt% sont préparées comme précédemment décrit. Succinctement, des précultures et cultures de bactéries sont effectuées, les culots obtenus après centrifugation sont dispersés dans une solution d'alginate à 4 wt%. Un prélèvement de ces suspensions permet d'évaluer leur concentration initiale qui se révèle être de  $6.10^{10} \text{CFU.ml}^{-1}$  et de  $10^7 \text{CFU.ml}^{-1}$ .*

*Ces suspensions sont structurées par congélation directionnelle à la vitesse de  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$ . Les solutions de réticulation de chlorure de calcium (20 mL à 1 M) sont pré-refroidies à  $-3^\circ\text{C}$  et les matrices congelées précédemment sont stabilisées par réticulation topotactique – les moules de polystyrène sont préalablement enlevés.*

*Après 24 heures les hydrogels obtenus sont découpés en petits pavés et rincés plusieurs fois à l'eau. Des bains de déshydratation dans l'éthanol sont réalisés – de 50% puis 75%, 90%, 96% puis deux fois 100% pendant 10 minutes chacun – puis le séchage supercritique est effectué. Pour cela 22 cycles d'échanges sont réalisés avec du  $\text{CO}_2$  liquide sous haute pression (Revoir protocole exact pour les valeurs). Les hydrogels séchés sont ensuite recouverts d'une couche de 20 nm d'or avant d'être observés au MEB.*



**Figure III-13:** Clichés MEB des hydrogels préparés par séchage supercritiques structurés à  $25 \mu\text{m.s}^{-1}$ . Les clichés mettent en évidence la présence des bactéries dans les murs réticulés d'alginate ainsi que leurs concentrations de  $6.10^{10} \text{CFU.ml}^{-1}$  (gauche) et de  $10^7 \text{CFU.ml}^{-1}$  (droite). Sur clichés A' et B' les bactéries visibles dans les coupes sont mises en évidence en vert. Échelle :  $2 \mu\text{m}$  et  $1 \mu\text{m}$  pour A et B.

Les clichés MEB de la Figure III-13 montrent des murs d'hydrogel à deux concentrations différentes. En A et A', la concentration y est de  $6.10^{10} \text{CFU.ml}^{-1}$ , en B et B' elle est de  $10^7 \text{CFU.ml}^{-1}$ . Les bactéries visibles en A et B sont coloriées en vert, en A' et B', afin de faciliter leur visualisation. On peut voir que pour la concentration initiale la plus élevée, de nombreuses bactéries sont en contact les unes avec les autres. Pour la plus faible concentration au contraire on peut voir une bactérie isolée dans le mur. De plus, les bactéries encapsulées sont le plus souvent isolées, contrairement à la concentration de  $6.10^{10} \text{CFU.mL}^{-1}$  où des bactéries sont présentes en grand nombre, agrégées et observables tout le long des murs.

Comme montré précédemment, la forte concentration de bactéries lors de l'étape de freeze-casting ne semble pas être critique pour la viabilité cellulaire et permet même une conservation parmi les meilleurs obtenues dans cette thèse. Cette concentration initiale joue cependant un rôle important lors de l'étape de réticulation topotactique où plus de 99,99% (4 logs) des bactéries ne survivent pas dans le cas d'une concentration initiale de  $6.10^{10} \text{CFU.mL}^{-1}$ . En nette opposition avec ces résultats, l'utilisation d'une concentration initiale de  $10^7 \text{CFU.mL}^{-1}$  permet

la survie de 10% des bactéries encapsulées lors du freeze-casting. Les résultats encourageants obtenus ici sont bien supérieurs à ceux obtenus après le protocole comprenant l'étape de lyophilisation.

Il serait possible que le contact entre les bactéries lors de l'étape de la réticulation topotactique soit un élément critique pour leur survie. Lors de la réticulation topotactique, la forte concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  induit un stress osmotique aux bactéries : elles vont se déshydrater, augmentant ainsi leur concentration interne en soluté afin d'atteindre l'équilibre osmotique avec leur environnement. Lorsque la concentration en ions du milieu est trop grande, la déshydratation peut devenir létale pour les bactéries. Nous pouvons alors formuler une hypothèse pour expliquer l'impact de la concentration initiale des *P. putida* sur leur viabilité lors de l'étape de réticulation topotactique : Dans le cas d'une concentration de bactéries de l'ordre de  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> et inférieurs, les bactéries auraient tendance à être encapsulées dans les parois en étant entourées seulement d'alginate – comme représenté dans la Figure III-13, B. Ainsi, bien qu'elles subissent un choc osmotique lorsque la solution ionique entre en contact, elles pourraient être protégées en partie par l'alginate qui les entoure. Il a en effet été montré que l'alginate joue un rôle important dans la régulation et la conservation de l'hydratation des bactéries, qui en produisent par ailleurs elle-même en réponse à un stress osmotique important<sup>269</sup>.

Dans le cas d'une concentration initiale de l'ordre de  $6.10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup>, les bactéries semblent, pour la majorité, en contact avec d'autres bactéries. En présence de la solution réticulante, les bactéries devraient se déshydrater et, par le fait même, se contracter créant ainsi des cavités au sein des parois. Ces cavités pourraient alors se remplir en solution de réticulation, concentré en ions. Les bactéries précédemment en contact, due à leur agrégation, seraient alors exposées à ces cavités remplies de solution ionique concentrées et pourraient subir un stress osmotique plus important. Bien que le regroupement de bactéries en conditions natives tend à améliorer leur viabilité par la formation d'un biofilm protecteur face à de nombreux stress<sup>266,268,306</sup>, ce processus est long et nécessite plusieurs étapes<sup>85</sup> et le procédé de congélation directionnelle et de réticulation topotactique ne devrait pas permettre sa formation dans le temps imparti. Des expériences supplémentaires sont à réaliser afin de pouvoir valider ou infirmer ces hypothèses et compléter ces réflexions.

### III.5 Conclusion

Les matrices cellularisées et congelées nécessitent des étapes supplémentaires de stabilisation en milieux aqueux en vue de l'obtention d'hydrogels cellularisés utilisables pour la biodégradation d'eaux usées. La stratégie classique de lyophilisation puis de réticulation au ions  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne une mortalité importante des bactéries encapsulées.

Dans cette partie, un nouveau procédé a été mis au point en adaptant une méthode précédemment développée au LCMCP. La réticulation topotactique permet la fonte et le retrait des cristaux de glace ainsi que la conservation de la structure macroporeuse associée formée lors de la congélation directionnelle. Cette nouvelle technique permet alors la stabilisation sous forme d'hydrogels des matrices précédemment structurées, en une seule étape. Cette diminution du nombre d'étapes et du temps de réticulation ainsi que la suppression de la lyophilisation a permis d'améliorer significativement la survie des bactéries encapsulées au sein des matrices. De plus aucun cryoprotecteur potentiellement toxique n'est utilisé tout au long des procédés, permettant de s'affranchir des étapes d'addition et de retrait de ces molécules. En effet, l'utilisation de l'alginate comme matrice d'encapsulation – grâce à son action de cryo-protection extracellulaire<sup>243,248,307</sup> et à sa capacité de maintien de l'hydratation – permet l'amélioration significative du taux de survie bactérienne durant l'étape de congélation directionnelle et de réticulation topotactique.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une vitesse de progression du front de glace de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  et une concentration de  $1,5 \cdot 10^9 \text{ CFU.mL}^{-1}$ . La concentration initiale de bactéries a en effet un impact sur le taux de survie après la réticulation topotactique. Il semblerait que l'agrégation des bactéries soit un facteur non négligeable lors de la réticulation topotactique.

Une proportion encourageante de bactéries est maintenue vivante dans les parois de ces hydrogels structurés et macroporeux, *quid* de la capacité de ces matériaux à dépolluer des eaux usées ?







# **Chapitre IV : Biodégradation**



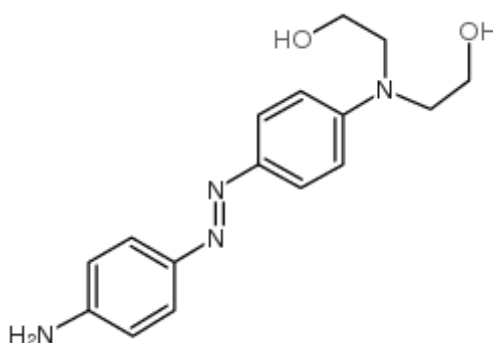
## IV.1 Biodégradation

L'industrie textile utilise une grande quantité d'eau à travers différents procédés de transformation, qu'elle rejette en générant un grand volume d'eaux usées contenant d'importantes quantités de colorants, de détergents et d'additifs<sup>64,308,309</sup>. En particulier, les étapes de teintures de textiles peuvent utiliser jusqu'à 150 litres d'eau par kilogramme de tissu<sup>310</sup>. Les colorants azoïques (possédant un groupe -N=N-) constituent la classe de colorants la plus utilisée à travers le monde ( $\geq 60\%$ ) et une grande proportion se retrouve rejetée dans l'environnement – dont la concentration peut varier entre 5 et 200 mg/L (l'unité que nous utiliserons alors sera exprimé en partie par million : « ppm »). Malheureusement la quantité exacte de colorant ainsi relarguée est inconnue mais peut être estimée à environ 1-2% des colorants produits et 5-10% des colorants utilisés et varie fortement dépendamment des sites de production et d'utilisation<sup>18,20,311</sup>.

Dans le cadre de la biodégradation des colorants présents dans les eaux usées, de nombreuses études utilisent des bactéries du genre *Pseudomonas*<sup>119,312,313</sup>, notamment l'espèce *Pseudomonas putida*<sup>262,263,314</sup> pour leur capacité à dégrader les colorants azoïques. Ces différentes études montrent la possibilité de dégradation des colorants azoïques sous conditions aérobiques par la souche de *Pseudomonas putida mt2*, utilisée aussi au cours de cette thèse, bien que cette voie de dégradation ne soit considérée initialement possible que sous condition anaérobique. En effet, bien que le système d'azo-réduction (utilisant l'enzyme azoréductase) soit plus efficace en condition d'anaérobie – à cause de la compétition avec le système de respiration aérobique – la biodégradation aérobique reste possible. Cette souche a été adoptée au cours de cette thèse pour les études de dégradation de colorants azoïques.

Le but de cette dernière partie de la thèse est alors d'étudier la possibilité de conservation des capacités de biodégradation des bactéries une fois encapsulées dans les matrices et stabilisés en hydrogel par la réticulation topotactique. Le travail effectué dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec Léa Alonso lors de son stage de master 2 que j'ai co-encadré. Pour cela il est important de pouvoir quantifier efficacement la concentration du colorant à l'aide de mesures de spectrométrie UV-Vis afin d'assurer le suivi de la dépollution. Pour cela plusieurs tests de biodégradation ont été réalisés sur différents colorants azoïques tels que le 2,5-dichloro-4-[3-méthyl-5-oxo-4-(4-sulfonatophényl)diazényl-4H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonate de dissodium (aussi nommé Jaune 2G ou E107 dont l'usage en tant que colorant alimentaire a été interdit), le 2-(éthyl{4-[(E)-(4-nitrophényl)diazényl]-phényl}amino)ethanol (rouge disperse 1)

ainsi que le 2,2'-[4-(4-aminophénylazo)phénylimino]diéthanol (noir disperse 9 que nous nommerons DB9 pour son nom commercial en anglais : Disperse Black 9). Les résultats de biodégradation du jaune 2G ainsi que du rouge disperse 1 ne seront pas présentés ici. Ces colorants ne sont pas des modèles faciles à utiliser à cause soit de leur trop faible solubilité (d'une valeur d'environ 170 µg/L pour le rouge disperse 1) soit à cause de difficultés à quantifier l'évolution de leur concentration (couleur du milieu de culture proche de celui du colorant jaune 2G).



**Figure IV-1:** Structure chimique du noir disperse 9 (DB9) comprenant le groupement azoïque (-N=N-) pouvant être dissocié par les azoréductases des *Pseudomonas putida*<sup>262</sup> (en association avec NADH).

Le choix du milieu de culture des bactéries et du milieu pollué a été réalisé en comparant plusieurs études<sup>314,315</sup> afin d'obtenir un milieu de culture permettant le développement des bactéries mais aussi pour permettre la quantification des colorants et leur biodégradation. Le milieu alors utilisé pour la croissance des bactéries et pour le suivi de la dépollution est un milieu de culture minimal, contenant le strict nécessaire à la croissance des bactéries et qui est incolore pour permettre une quantification des colorants (la composition est explicitement décrite dans la section matériel et méthode). Les résultats des tests de biodégradation du DB9 par les *Pseudomonas putida mt2* sont présentés dans l'expérience suivante.

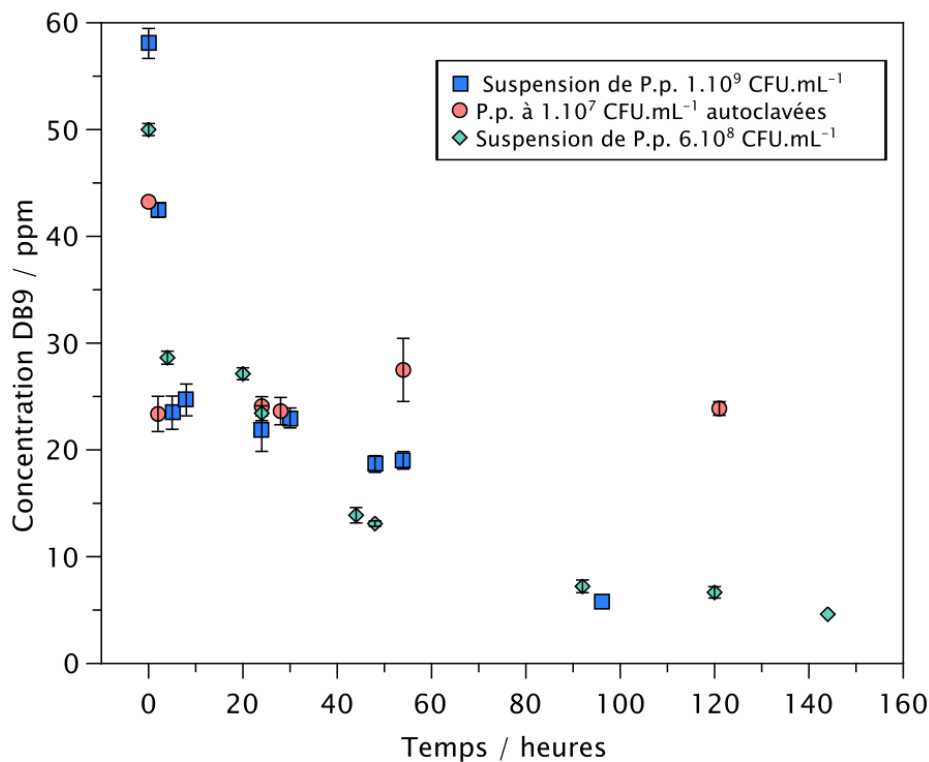
#### *Matériel et méthode : Biodégradation du Disperse black 9 par Pseudomonas putida en suspension*

Une préculture de *P. putida* est préparée en mélangeant 100 µL d'un aliquote conservé à -80°C avec 9,9 mL d'un milieu de culture minimal, filtré avec une unité de filtration à 0,22 µm, contenant 50 ppm de polluant Disperse Black 9 (DB9). La composition de ce milieu de culture (MG7f<sub>5</sub>) est la suivante : 3 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01 g.L<sup>-1</sup> NaCl; 0,1 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,001 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>; 0.8096 g.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl et 5 g/L de D-(+)-glucose. Après une nuit d'incubation à 30°C et sous agitation à 150 RPM, 1,2 mL de cette préculture sont prélevés

et mélangés à 58,8 mL du même milieu de culture minimal MG7f<sub>5</sub>, toujours avec 50 ppm de DB9<sup>316</sup>, pour obtenir la culture. Cette suspension est placée à incuber pendant une nuit.

Cette culture est ensuite séparée en 2 tubes de 30 mL qui sont centrifugés à 3046 G pendant 20 min. Les culots sont redispersés dans 30 mL de milieu MG7f<sub>5</sub>, des prélèvements de cette solution sont utilisés pour faire un comptage en boîte de Petrie afin de déterminer la concentration en bactéries ; 2 mL sont ensuite prélevés et mélangés au milieu de culture minimum pollué dont l'absorbance est mesurée par spectromètre UV-Visible, entre 300 et 800 nm à différents temps de dépollution. Cette expérience de dépollution est réalisée en triplicata dans des flasques (en condition d'aérobie grâce au bouchon perméable contenant un filtre de 0,22 µm) contenant 40 mL de la solution, mises à 30°C sous agitation pendant plusieurs jours. Des mesures d'absorbance sont réalisées sur 3x200 µL de la suspension, après centrifugation et filtration (0,22 µm), avec un lecteur multi-plaques à différents temps. Cette expérience a été répétée avec une concentration en bactérie inférieure (dilué par 2).

La longueur d'onde d'absorption maximale est de 462 nm pour le DB9 et est utilisée pour suivre l'évolution de sa concentration dont la valeur est calculée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée dans le milieu.



**Figure IV-2:** Représentation graphique de l'évolution de l'absorbance à 462 nm du colorant Disperse Black 9 en présence de *P. putida* en suspension. Les concentrations des bactéries en

suspensions sont  $1.10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> et  $6.10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. L'évolution de la concentration de colorant en présence d'une suspension de bactéries autoclavées ( $1,4.10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>) est représentée en rouge.

Le suivi de la concentration du DB9 permet d'évaluer le rôle des bactéries *Pseudomonas putida mt2*, cultivées en milieu minimal pollué, sur la biodégradation de la liaison azo à différentes concentrations de bactéries. Cette expérience est réalisée en conditions aérobiques, sous agitation, et des mesures de l'absorbance de la solution sont effectuées régulièrement afin de quantifier la concentration en DB9 grâce à une courbe d'étalonnage précédemment réalisée. Cette première expérience de biodégradation permet de mettre en avant la possibilité d'utilisation du DB9 comme modèle pour la quantification de l'impact de l'encapsulation des bactéries sur leur capacité à dégrader des colorants azoïques.

Durant les 4 premières heures de chaque expérience représentée en Figure IV-2 – pour les deux concentrations de bactéries et également pour les bactéries autoclavées – une décroissance drastique de la concentration en polluant est observée, passant d'environ 50 ppm à 25 ppm. Puis la concentration semble diminuer lentement pour les suspensions de bactéries alors qu'un plateau est atteint dans le cas des bactéries autoclavées. En effet, pendant que la concentration en polluant reste autour de 25 ppm pour les bactéries mortes, la concentration en DB9 diminue passant de 25 ppm à environ 5 ppm pour les suspensions de bactéries actives.

Cette expérience montre plusieurs étapes dans la biodégradation : tout d'abord lors des premières heures, une diminution de la concentration en DB9 est constatée en présence de bactéries, actives et autoclavées. Cette étape pourrait traduire une absorption ou une adsorption du colorant sur les bactéries, qu'elles soient vivantes ou mortes. Puis la concentration en colorant suit deux évolutions différentes, en présence de bactéries autoclavées la concentration en DB9 est constante alors qu'en présence des suspensions de bactéries vivantes une diminution est constatée. Ainsi, bien que le colorant soit en partie adsorbé par les bactéries autoclavées, il est nécessaire qu'elles maintiennent une activité métabolique pour les dépolluer. En effet, les azoréductases permettant la réduction de la liaison azoïque nécessitent la coenzyme NADH et la réaction est donc dépendante du métabolisme cellulaire<sup>317</sup>. Cette expérience montre aussi que le colorant DB9 peut être adopté comme modèle pour analyser la dépollution d'eau usée par les *Pseudomonas putida* utilisées dans cette thèse.

Ce colorant est alors utilisé dans l'expérience suivante où les bactéries sont encapsulées dans des hydrogels structurés par congélation directionnelle – avec un front de glace de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  – et stabilisés par réticulation topotactique.

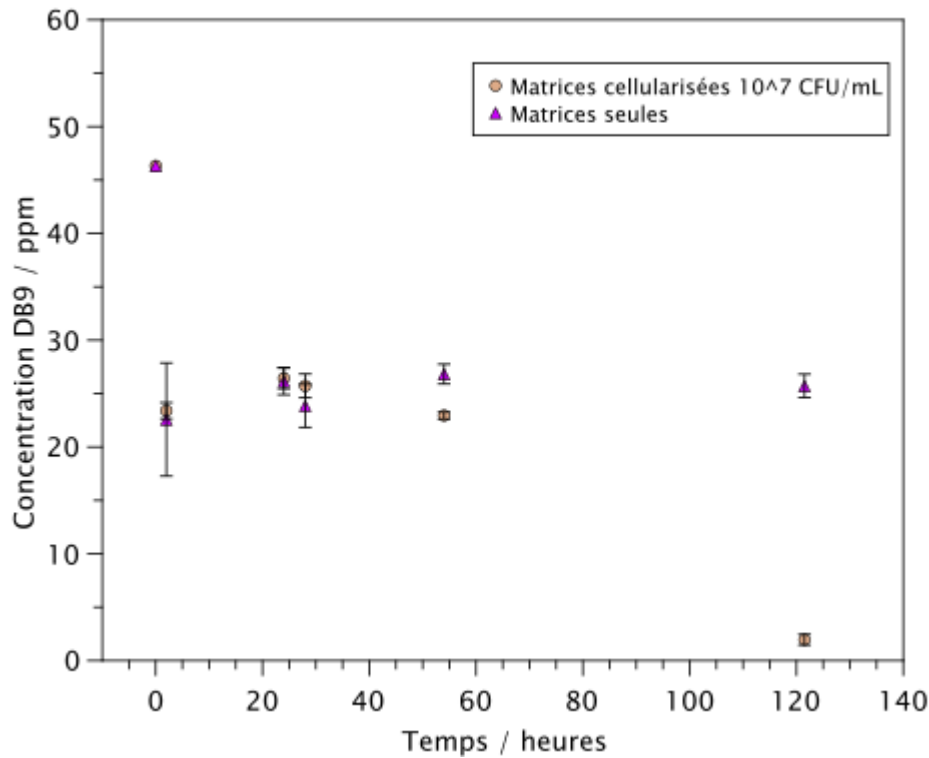
### *Matériel et méthode : Biodégradation du Disperse black 9 par les Pseudomonas putida encapsulées*

*Une préculture de bactéries Pseudomonas putida est préparée en mélangeant 100 µL d'un aliquote conservé à -80°C avec 9,9 mL du milieu de culture minimal MG7f<sub>5</sub>, filtré avec une unité de filtration à 0,22 µm, contenant 50 ppm de polluant Disperse Black 9 (DB9). Après une nuit d'incubation à 30°C et sous agitation à 150 RPM, 1,2 mL de cette préculture sont prélevés et mélangés à 58,8 mL du même milieu de culture minimal MG7f<sub>5</sub>, toujours avec 50 ppm de DB9. La culture ainsi obtenue est placée à incuber pendant une nuit.*

*Cette culture est ensuite centrifugée et le culot est dispersé dans un volume équivalent à celui de la culture par une solution d'alginate stérile à 4 wt%. Un comptage en boîte de Petrie est effectué sur cette suspension et des matrices sont formées par congélation directionnelle en imposant une vitesse de front de glace de 50 µm.s<sup>-1</sup>. Ces matrices cellularisées sont ensuite stabilisées par réticulation topotactique pendant 1 jour et après 3 bains de lavage à l'eau ultrapure stérilisée, elles sont utilisées pour les tests de dépollution. Des hydrogels d'alginate sont préparés de même sans bactéries pour servir de contrôle. Ces hydrogels cellularisés et non-cellularisés sont placés dans des flasques contenant 40 mL de la solution MG7f<sub>5</sub> avec 50 ppm de DB9. La mesure de l'absorbance est réalisée sur 3x200 µL, après centrifugation et filtration (0,22 µm), par un lecteur multi-plaques à différents temps. L'absorbance à 462 nm est utilisée avec la courbe d'étalonnage afin de déterminer l'évolution de la concentration en DB9.*

*À chaque prélèvement 1 mL de la solution est prélevée, filtrée et stockée à -80°C afin de réaliser des analyses HPLC (chromatographie liquide à haute performance). La phase éluante A, est de l'eau ultra pure et la phase B du méthanol. On applique un ratio V<sub>A</sub>/V<sub>B</sub> (40/60), un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> et une contre pression de 151 atm. On injecte 20 µL dans une colonne Gemini 5µm Phenomenex C18 (en phase inverse). Le système HPLC est couplé à un spectromètre UV-Vis (longueur d'onde du pic principale du DB9 462 nm) pour la détection et la quantification des espèces séparées.*





**Figure IV-3:** Représentation graphique de l'évolution de la concentration du colorant DB9 dans le milieu en fonction du temps. Des hydrogels seuls ainsi que des hydrogels cellularisés – structurés par congélation directionnelle à une vitesse de front de glace de  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  – sont ici utilisés.

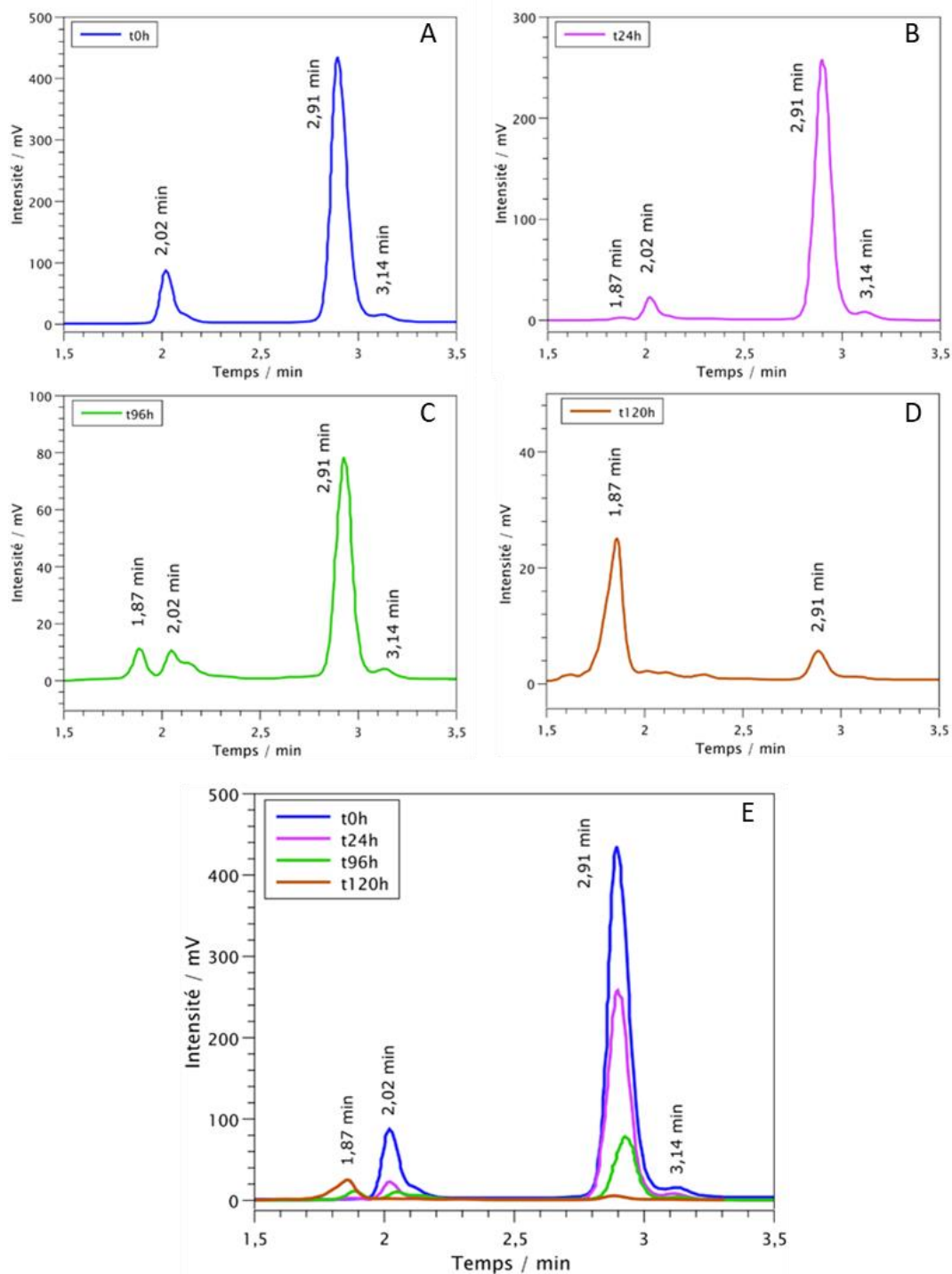
Dans l'expérience dont les résultats sont exposés en Figure IV-3, des hydrogels cellularisés et des hydrogels non-cellularisés formés à partir des solutions d'alginate ont été utilisés. Leur impact sur l'évolution de la concentration en DB9 a été mesuré à différents temps par le suivi de l'absorbance du milieu à 462 nm. La concentration de bactéries contenue dans les hydrogels cellularisés est de  $1,4 \cdot 10^7 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cette expérience permet de discriminer l'impact des hydrogels de l'activité de biodégradation et donc de mesurer l'efficacité de dépollution des bactéries encapsulées par le procédé présenté dans cette thèse.

Les concentrations mesurées lors de cette expérience suivent une évolution semblable à celles de l'expérience précédente (Figure IV-2). En effet, on observe tout d'abord une forte diminution de la concentration du polluant puis, dans le cas des hydrogels non-cellularisés, un plateau est atteint où la concentration de colorant ne varie plus. Il est intéressant de noter que dans les cas des hydrogels cellularisés, au cours des 28 premières heures, le profil de la concentration en polluant suit celui des hydrogels seuls, suggérant un premier mécanisme commun porté par les hydrogels et donc indépendant de la présence de bactéries. Une différence commence à être observée à partir d'environ 54 heures avec une diminution de la concentration de DB9. Enfin, au bout de 120 heures, une concentration de 2 ppm est mesurée pour les

hydrogels cellularisés tandis que la concentration du colorant en absence de bactéries est d'au moins un ordre de grandeur au-dessus.

Ces données semblent montrer que l'hydrogel d'alginate absorbe rapidement une certaine quantité de polluant qui est similaire à son absorption par les bactéries en suspensions, observée lors de l'expérience précédente. La concentration en polluant dans le milieu où baignent les hydrogels non-cellularisés est d'environ 25 ppm, il en est de même pour les hydrogels cellularisés. Ainsi la présence de la matrice d'alginate comme matrice d'encapsulation ne semble pas impacter le phénomène d'absorption observé en présence de bactéries en suspension. Enfin la décroissance de la concentration en DB9 en présence des hydrogels cellularisés semble indiquer une activité de biodégradation.

Les prélèvements du milieu pollué réalisés ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) afin d'étudier l'évolution de la composition du milieu en présence d'hydrogels cellularisés.

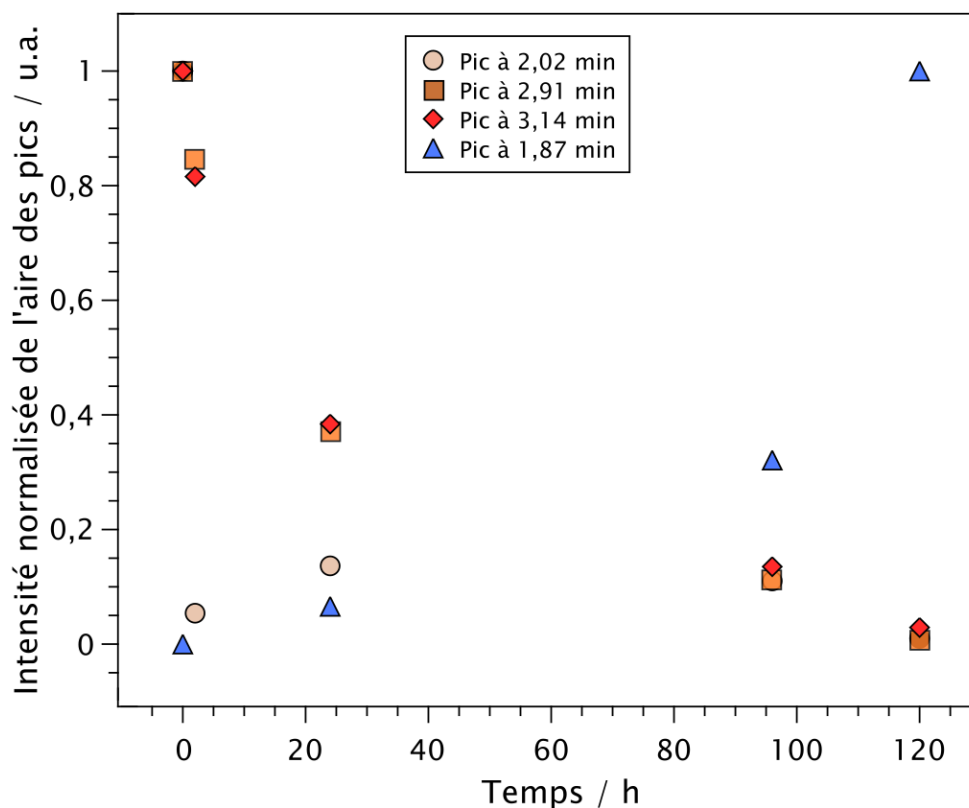


**Figure IV-4:** Les chromatogrammes des prélèvements des milieux pollués aux différents temps lors de la biodégradation par les hydrogels cellularisés sont ici présentés. Le chromatogramme du milieu pollué initial est en bleu (A), celui en magenta est obtenu après 24 heures d'expérience (B), celui en vert après 96 heures de dépollution (C) et en rouge après 120 heures (D). Ces chromatogrammes sont comparés en figure E.

La technique de chromatographie liquide haute performance permet de séparer les molécules présentes dans un milieu grâce à leurs interactions avec la phase stationnaire (qui caractérise la colonne d'analyse) et permet la détection de différentes espèces en fonction de leur temps de

rétenion dans la colonne. Le chromatogramme du milieu pollué au temps initial apparait en bleu et trois pics distincts peuvent être observés : le premier apparait avec un temps de rétenion de 2,02 min, le deuxième de 2,91 min et le dernier de 3,14 min. Une analyse HPLC du milieu de culture minimal a aussi été réalisé et aucun pic n'y est observé, ainsi les trois pics observés initialement (A de la Figure IV-4) semblent caractéristiques du DB9 – on peut formuler les deux hypothèses suivantes : Les cycles aromatiques présents dans les molécules des DB9 pourraient interagir via des empilements  $\pi$ - $\pi$  (interactions attractives non covalentes entre cycles aromatiques) et former des multimères physiques. Ou bien ces multimères pourraient être formés par des liaisons hydrogènes entre les groupements alcools et amines (les azotes de la liaisons azoïques peuvent aussi être impliqués)<sup>318</sup>. Ainsi, un des pics correspondrait au temps de rétenion caractéristique des molécules de DB9 seules et un second temps de rétenion correspondrait à une dimérisation, la même occurrence pourrait être appliqué au dernier pic (des études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse ainsi que pour trouver les correspondances entre les différents pics et les conformations correspondantes). Après 24 heures de dépollution en présence d'hydrogels cellularisés – représenté en magenta – les trois pics sont encore présents mais moins intenses et un nouveau pic est observé à 1,87 min de temps de rétenion. Après 96 heures de dépollution, l'intensité des trois pics a encore diminuée et celle du pic à 1,87 min augmente. Ce nouveau pic est aussi observé après 120 heures où son intensité a encore augmenté tandis que les trois autres pics ont drastiquement diminué. Le pic apparaissant à 1,87 min semble traduire la présence d'une nouvelle molécule ayant moins d'affinité avec la colonne et pourrait être attribué à un produit de dégradation.

La quantification des molécules séparées par HPLC a été réalisée à une longueur d'onde de 463 nm, et correspond au maximum d'intensité du spectre d'absorption du colorant DB9. Il est important de noter ici un changement de couleur de la solution lors de l'expérience de dépollution, où une couleur rouge est finalement obtenue. En effet le spectre d'absorption après 120 heures de biodégradation possède un pic principal à 325 nm. Les données récupérées lors de ces expériences ne permettent alors pas de quantifier la concentration des produits de dégradation. Cependant il est possible d'avoir une représentation de l'évolution du DB9 et des produits de dégradation détectés dans cette configuration en normalisant les pics obtenus par HPLC. La Figure IV-5 est obtenue en intégrant les pics précédemment décrits et en les normalisant – par la valeur maximale obtenue pour chaque pics (à t0h pour les trois pics caractéristiques du DB9 et à t120h pour le pic des produits de dégradation).



**Figure IV-5:** Évolution relative de l'intégration des pics observés en HPLC aux différents temps de dépollution. L'intégration des pics caractéristiques du DB9 sont représentées en nuance orange et pour les produits de dégradation en triangles bleue.

Une décroissance rapide de la surface des pics à 2,91 min et 3,14 min peut être observée dans Figure IV-5. L'intégration de ces deux pics – représentés par les losanges et les carrés – semble suivre la même évolution au cours de l'expérience. Pour le pic à 2,02 min (aussi caractéristique du DB9) une diminution est observée dans les premiers temps en atteignant une sorte de plateau. Pour le pic identifié comme décrivant les produits de dégradation, la surface augmente progressivement puis une grande quantité de produit de dégradation est retrouvée au dernier temps de mesure.

La différence d'évolution observée pour le pic à 2,02 min pourrait être en relation avec l'état des molécules du colorant en solution. Dans le cas où le premier pic à 2,02 min correspondrait aux molécules de DB9 en solution sous forme individuelle (non dimérisées) et où les pics suivants correspondraient à des multimères, leur biodégradation par les bactéries devrait suivre des cinétiques différentes. Il est ainsi possible que seule la forme de molécule isolée soit directement dégradée par l'azoréductase et qu'un équilibre entre les molécules dimérisées et les molécules individuelles s'établisse. Cependant nous n'avons pas pu étudier ces hypothèses et d'avantage d'expériences sont nécessaires, la détermination précise des composantes des différents pics et leur interaction avec les bactéries serait ainsi idéale (par exemple, avec

l'utilisation d'un couplage à un spectromètre de masse pour identifier les sous-produits, et une diffraction X pour la formation de multimères). Le suivi d'absorbance présenté précédemment ainsi que la disparition des pics caractéristique observé en HPLC – et l'apparition de pics à un temps de rétention plus court – nous permet néanmoins d'affirmer que la souche *Pseudomonas putida* utilisée lors de ces expériences est capable de dégrader le DB9 même après le processus d'encapsulation dans des hydrogels.

L'évolution des pics caractéristiques du DB9 semble similaire à l'évolution de la concentration des polluants observés précédemment dans le cas des *Pseudomonas putida* libres en suspension présentées plus tôt. Deux hypothèses peuvent être énoncées. Les bactéries encapsulées auraient-elles la même efficacité que les bactéries en suspension ? Ou bien les bactéries ont-elles été relarguées lors de l'expérience permettant la biodégradation dans des conditions similaires ? Malheureusement, les matrices d'alginate se sont partiellement désagrégées au cours de l'expérience et des précipités blancs sont apparus. De plus un relargage des bactéries dans le milieu a été observé et confirmé par prélèvement et culture du milieu où des colonies de bactéries sont apparues. Cette déstructuration des matrices peut s'expliquer par la présence de phosphates dans le milieu de culture utilisé pouvant former des phosphates de calcium, un précipité blanc. En complexant le calcium, le phosphate va entrer en compétition avec les liaisons ioniques permettant la réticulation de la matrice d'alginate. La précipitation des phosphates de calcium va déplacer l'équilibre diminuant le nombre de liaison calcium-alginate et donc mener à une redissolution partielle des hydrogels.

Comme montré dans la littérature, les hydrogels d'alginate de calcium sont stables en milieu acide mais gonflent et se déstructurent en milieu alcalins et en milieu salins<sup>271</sup>. Ainsi la présence de cations peut modifier la structure en remplaçant le calcium à travers des échanges d'ions – même des cations monovalents à haute concentration peuvent déstabiliser ces hydrogels en prenant la place du calcium et en induisant une répulsion électrostatiques entre les chaînes d'alginate<sup>277</sup>. De même, la présence de molécules chélatantes des ions calcium (par exemple l'EDTA<sup>319</sup>, des polyphosphates<sup>320</sup> et des citrates<sup>300,321</sup>) sont critiques pour la stabilité de ces hydrogels d'alginate.

Ainsi une stabilisation supplémentaire semble nécessaire afin de pouvoir utiliser les hydrogels d'alginate cellularisés développés dans cette thèse.

## IV.2 Stabilisation des hydrogels par revêtement de chitosane

Des études précédentes menées au laboratoire par Sarah Christoph portaient sur l'encapsulation de levures et de bactéries par freeze-casting. Les matrices d'alginate obtenues étaient lyophilisées puis réticulées avec des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et un problème de stabilité des matrices était alors aussi observé. La solution adoptée lors de sa thèse fut de réaliser un revêtement de silice sur les parois des matrices macroporeuses. Cependant, le revêtement obtenu en phase gaz – par l'utilisation de TEOS (orthosilicate de tétraéthyle) – nécessitait plusieurs jours (plus de 10 jours) et une forte baisse de la viabilité était observée. Une solution alternative a été testée avec l'utilisation d'un revêtement en phase liquide par l'utilisation d'une suspension colloïdale de particules de silice (LUDOX et silicate de sodium). Le principal avantage de cette technique reposait sur l'introduction d'une grande quantité de silice dans un temps court, cependant le contrôle de l'épaisseur du revêtement était perdu. Bien que la viabilité cellulaire était acceptable – perte de 70% de la viabilité à cette étape pour un taux de survie du procédé finale de 0,03% (concentration initiale de  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> et de  $3.10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> pour le matériau final)<sup>103</sup> – la couche formée était composée de petits agrégats discontinues et ne semblait pas améliorer la stabilité des matrices<sup>103</sup>.

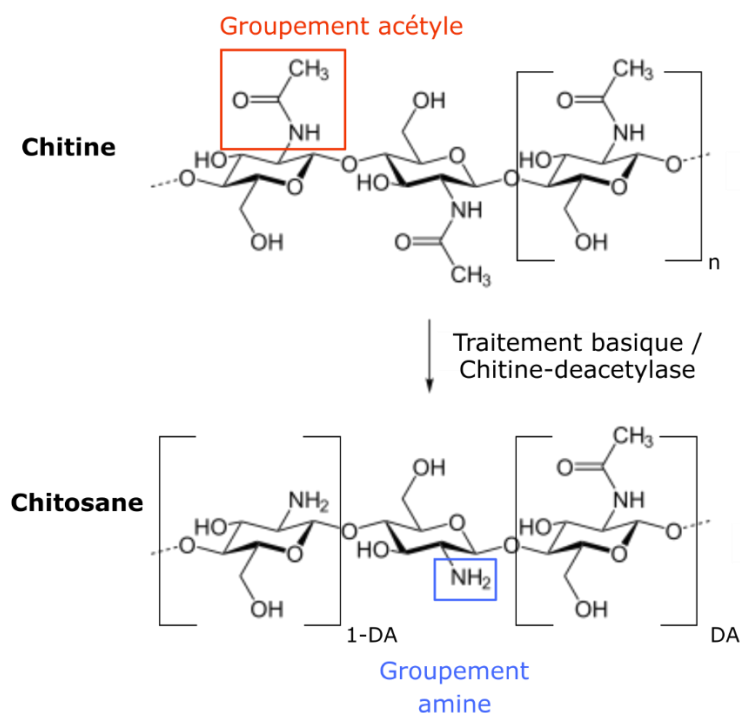
Lors de recherches bibliographiques sur des alternatives au revêtement de silice présenté précédemment, différentes stratégies ont semblé propices à la stabilisation des hydrogels cellularisés. Une première approche est la stabilisation par réticulation covalente des matrices (remplaçant ainsi la réticulation ionique plus sensible). Cependant les techniques de réticulation covalente classiques nécessitent l'utilisation de molécules toxiques causant une perte de la viabilité et de l'activité des cellules encapsulées<sup>81</sup>. Le glutaraldéhyde – dont une concentration supérieure à 0.2% est associé à une dénaturation de certains enzymes diminuant l'activité métabolique – ainsi que la génipine<sup>322,323</sup> peuvent être utilisés pour la réticulation covalente. Une adaptation de cette stratégie peut alors être faite par la réticulation covalente d'une couche de surface afin de diminuer l'impact de la toxicité de ces molécules sur les bactéries encapsulées (nécessitant ainsi l'utilisation d'un second polymère tel que la polyéthylèneimine<sup>324</sup>, la polydopamine<sup>325,326</sup> ou bien encore la poly-L-ornithine<sup>323</sup>). Cependant les molécules d'agents réticulant n'ayant pas réagi doivent impérativement être éliminées afin de limiter leur diffusion et leur impact sur la viabilité et activité des espèces encapsulées<sup>81,276</sup>. L'utilisation de coquilles de polymère photo-réticulé est une autre possibilité, ayant l'avantage de ne pas libérer de sous-produits toxiques, cependant l'irradiation UV nécessaire à la réticulation peut être

dommageable pour les cellules encapsulées (avec toutefois la possibilité d'une restauration dans certaines conditions de la croissance des cellules)<sup>161,327</sup>.

Une stratégie alternative à la stabilisation covalente des matrices d'alginate serait l'utilisation d'un polymère cationique comme revêtement. En effet, l'alginate étant un polyanion – ses groupement carboxylates sont chargés négativement (pKa entre 1,5 et 3,5) – il peut former des liaisons ioniques fortes avec les polymères chargés positivement (les plus couramment utilisés sont les polyamines) tels que les poly-L-lysine, les poly-L-ornithine ou encore le chitosane<sup>161,328</sup>. Cette stratégie est particulièrement intéressante car elle ne nécessite pas l'utilisation de réactifs toxiques et des polymères biocompatibles peuvent être utilisés. De plus cette étape de revêtement est rapide et facile à mettre en œuvre, le dépôt de la couche se fait par un simple bain dans une solution du polycation souhaité. Le chitosane est un bon candidat car il est abondant (sous sa forme acétylée appelée chitine il est un des polymère les plus produits naturellement et est également un sous-produit de l'industrie alimentaire<sup>146</sup>) peu cher et biocompatible. Il forme des liaisons avec l'alginate considérablement plus fortes que certains autres polycations évoqués, qui peuvent être considérées comme irréversibles<sup>329</sup> formant alors une coquille utilisée pour limiter le relargage (de cellules ou de médicaments)<sup>81,330</sup>. Nous avons choisi d'utiliser le chitosane pour stabiliser nos hydrogels cellularisés.

Le chitosane est obtenu à partir de la désacétylation de la chitine qui est un polymère naturel abondant qui se trouve principalement dans les coquilles et carapaces des insectes et crustacés ainsi que dans les parois cellulaires des champignons et des algues<sup>331,332</sup>. La transformation de la chitine en chitosane peut se faire soit par traitement en milieu alcalin soit par utilisation d'enzyme chitine-désacétylase et va permettre d'enlever les groupements acétyles au profit des groupements amines, rendant ainsi le polymère soluble en milieu acide (pH inférieur à 6)<sup>145</sup>. Comme représenté dans la Figure IV-6 Le degré de d'acétylation (DA) permet de décrire les molécules de chitosane et exercera une influence sur ses propriétés telles que sa solubilité (dont sa sensibilité au pH) et sa capacité à former des liaisons ioniques avec les polyanions. Ce biopolymère est appelé chitosane à partir d'un DA inférieure à 0,5.





**Figure IV-6:** Schéma de la désacétylation partielle de la chitine pour obtenir du chitosane. Le degré de désacétylation (DA) correspond à la proportion des groupements acétyles (en rouge) retirés au profit des groupements amines (en bleu).

Différents protocoles ont été développés pour former des revêtements de chitosane capables de protéger les capsules d'alginate contenant des cellules<sup>333,334</sup>. En effet, certaines études modifient les chaînes de chitosane pour améliorer le revêtement (notamment par la formation de chlorhydrate de chitosane)<sup>330</sup> ou encore élaborent des revêtements constitués de plusieurs couches successives de polycations et polyanions pour limiter d'avantage le relargage des cellules<sup>333-335</sup>. Cependant en tant qu'expérience exploratoire nous avons décidé d'utiliser une méthode simple et rapide, répertoriée dans différentes publications<sup>333,336</sup>, permettant la formation du revêtement par un simple bain dans une solution de chitosane.

#### *Matériel et méthode : revêtement de chitosane des hydrogels d'alginate cellularisés*

*Les polymères utilisés lors de ces expériences sont fonctionnalisés avec des fluorophores pour permettre leur observation ultérieure au microscope confocal : l'alginate est fonctionnalisé avec du FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et le chitosane avec du RITC (isothiocyanate de rhodamine) dont les protocoles sont en annexe (adapté de Lei 2016)<sup>336</sup>.*

*Une préculture de *P. putida* est effectuée comme décrit précédemment dans une solution de milieu minimal MG7f<sub>5</sub> contenant 50 ppm de DB9. Après une nuit d'incubation 1,2 mL de cette préculture sont ajoutés à 58,8 mL du même milieu pour former la culture. Elle est incubée*

pendant 24 heures. Cette culture est ensuite centrifugée à 3046 G pendant 20 min et le culot est redispersé dans 60 mL d'une solution d'alginate stérile à 4 wt% fonctionnalisée au FITC.

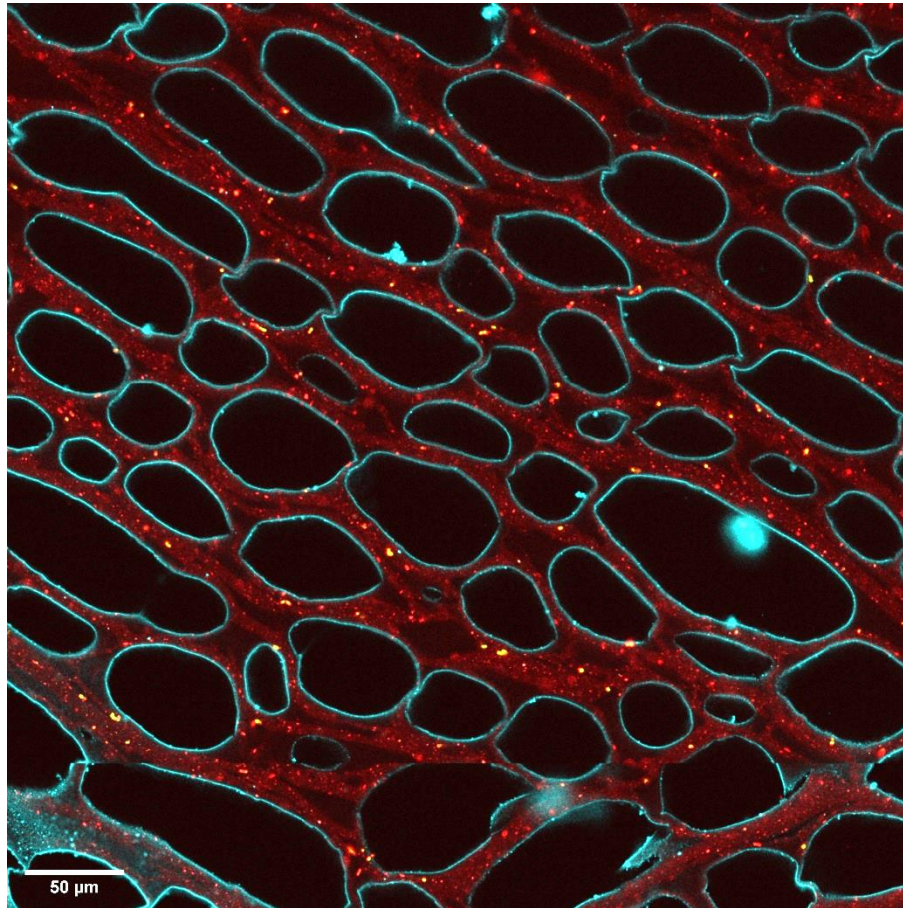
Ces suspensions sont ensuite structurées par congélation directionnelle (2 mL) à une vitesse de  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et les matrices obtenues sont stabilisées par réticulation topotactique – pendant 24 heures à  $-3^\circ\text{C}$  dans 20 mL de  $\text{CaCl}_2$ . Les hydrogels obtenus sont lavés 3 fois dans des bains d'eau stériles pendant 10 min afin d'enlever l'excès de calcium.

Pour effectuer le revêtement de chitosane, les poudres fonctionnalisées obtenues doivent être redispersées en solution. Pour cela 40 mg de chitosane fonctionnalisé au RITC sont dispersés dans 80 mL d'eau ultrapure stérile à laquelle sont ajoutés 600  $\mu\text{L}$  d'acide acétique glaciale. Après dissolution complète le pH est remonté à 6 avec l'ajout d'une solution aqueuse de NaOH à 0,5 M et de l'eau ultrapure est rajoutée pour compléter jusqu'à 100 mL. La solution ainsi obtenue sera ensuite filtrée (0,22  $\mu\text{m}$ ).

Les hydrogels sont ensuite plongés dans 15 mL de cette solution de chitosane fonctionnalisé au RITC pendant 10 min et rincées à l'eau. Certains hydrogels avec le revêtement sont utilisés pour une caractérisation au microscope confocale pendant qu'un triplicata est utilisé pour des tests de dépollution.

Pour la caractérisation au microscope confocal les hydrogels revêtus de chitosane sont découpés en fines lamelles – perpendiculairement à l'axe de croissance des cristaux de glace – qui sont ensuite placées dans 2 mL d'une solution de DAPI (marqueur fluorophore se liant à l'ADN des cellules et émettant une couleur bleue vers  $\lambda=456 \text{ nm}$ ). Cette solution est diluée par 50000 et 0,2% de surfactant Tween est ajouté pour perméabiliser les membranes des bactéries. L'observation est ensuite réalisée en collaboration avec l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) au microscope confocal inverse (Microscope ZEISS 980 FAST Airyscan II inversé) ayant une résolution de 300 nm. Une analyse est ensuite effectuée avec le logiciel ImageJ à l'aide d'une macro développée au sein de l'IBPS.

Les hydrogels préparés pour la dépollution sont placés dans 40 mL de milieu MG7f<sub>5</sub> contenant 50 ppm de DB9 et mis à l'incubateur sous agitation. En parallèle une expérience de dépollution de bactéries en suspension est réalisée tel que décrit précédemment. La mesure de l'absorbance est réalisée sur 3x200  $\mu\text{L}$ , après centrifugation et filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ), par un lecteur multi-plaques à différents temps. Le suivi de l'absorbance à 462 nm couplé à la courbe d'étalonnage permet déterminer l'évolution de la concentration en DB9.



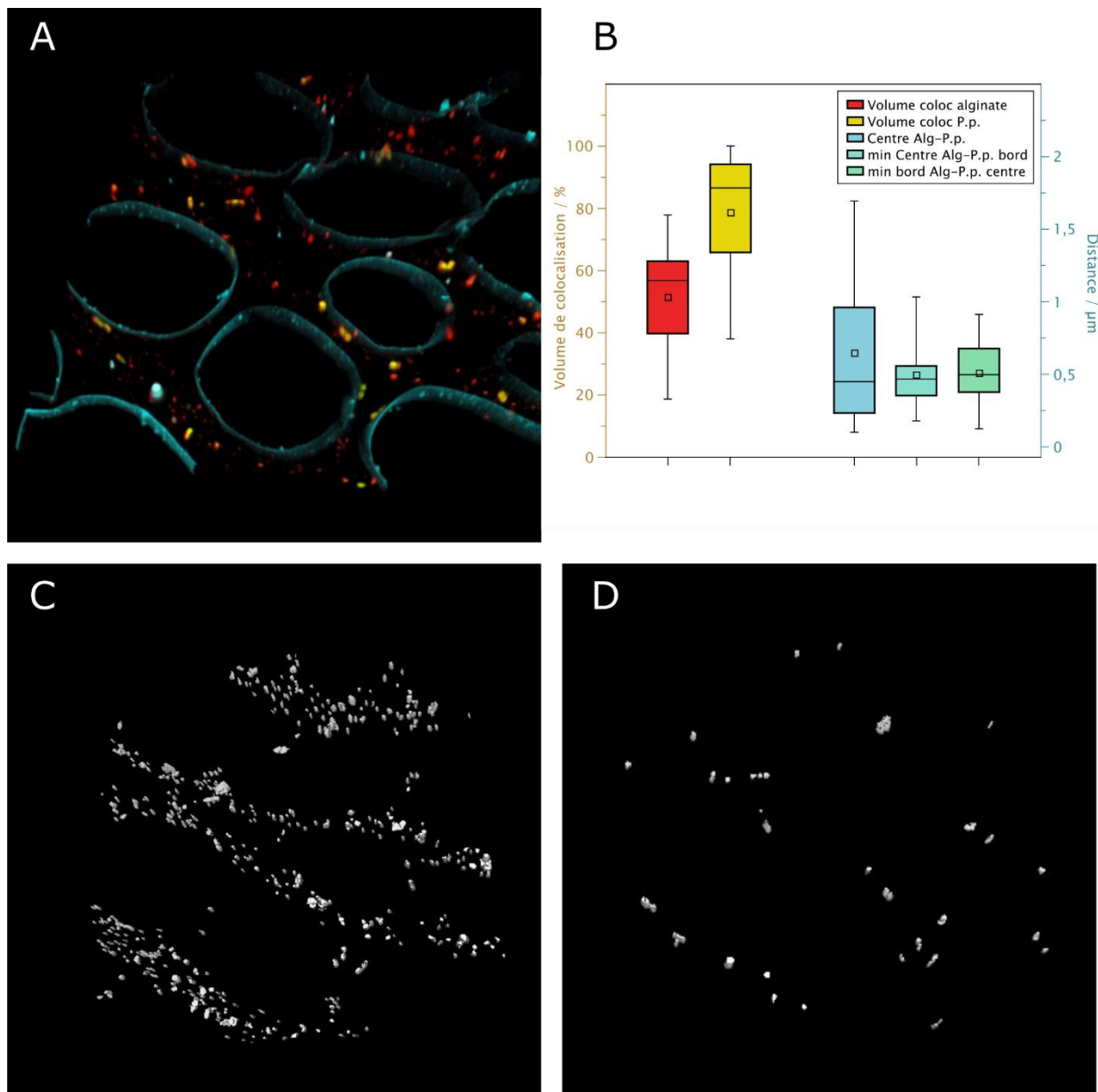
**Figure IV-7:** Cliché de microscopie confocale d'un hydrogel cellularisé avec un revêtement de chitosane. La matrice d'alginate est représentée en rouge, les bactéries sont représentées en vert – elles apparaissent alors en jaune lorsqu'elles sont superposées avec l'alginate – et le chitosane est représenté en cyan. Les pores créés par congélation directionnelle sont en noir.

Le revêtement de chitosane est effectué sur un hydrogel cellularisé et structuré à  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  stabilisé par réticulation topotactique. Les polymères utilisés lors de cette expérience sont préalablement fonctionnalisés avec des fluorophores afin de rendre leur observation possible par microscopie confocale. L'alginate est fonctionnalisé par du FITC (comme présenté aux chapitres précédents) et le chitosane est fonctionnalisé par du RITC (Isothiocyanate de rhodamine, dont le protocole est décrit en annexe). La première étape du protocole est l'abaissement du pH nécessaire à la solubilisation du chitosane fonctionnalisé (pH~2), cependant pour limiter l'impact de l'étape de revêtement sur la viabilité des bactéries, une remonté en pH est nécessaire. Le chitosane reste soluble à pH 6 et la capacité des *P.putida* à dégrader des polluants ne semble pas impacté à ce pH<sup>313,337</sup>. Le revêtement est alors appliqué par simple trempage des hydrogels dans la solution de chitosane pendant 10 minutes. Après un lavage à l'eau ultrapure, une partie des hydrogels cellularisés et enrobés sont préparés pour leur caractérisation par microscopie confocale et la seconde partie est déployée pour des essais de

dépollution. Ce protocole, simple et rapide, est idéal pour explorer cette stratégie de revêtement, mais permet aussi de penser à une transposition aisée en contexte industriel.

La Figure IV-7 présente un cliché obtenu via microscopie confocale (c'est une mosaïque reconstituée à partir de plusieurs clichés pris à plus fort grandissement), d'une coupe transversale par rapport à l'orientation de la croissance des cristaux de glace (lors de l'étape de congélation directionnelle). Les pores sont en noir, les parois d'alginate sont colorisées en rouge, les bactéries sont représentées en vert (elles apparaissent alors en jaune à cause de leur superposition avec l'alginate) et enfin le revêtement de chitosane apparaît en cyan. Il apparaît tout d'abord que toutes les parois sont recouvertes de chitosane et que l'alginate n'est plus en contact avec les pores. En effet le revêtement semble former une couche homogène tout autour des pores et aucune lacune n'a été observé. L'intensité du signal associé au chitosane semble proportionnelle à la taille des pores (plus le pore est grand et plus une grande quantité de chitosane semble avoir été déposé), cependant certains petits agrégats sont observables, peut être due à une reprecipitation du chitosane lors de la remontée en pH. Le procédé semble alors avoir été efficace pour réaliser un revêtement couvrant l'ensemble des pores via une liaison ionique entre l'alginate et le chitosane.

On peut remarquer dans ces clichés des zones plus concentrés en alginate, où une intensité plus élevée est observée ponctuellement (sur quelques microns). De plus certaines zones semblent moins concentrées en alginate et semblent reprendre le schéma de murs observé aux chapitre précédent, apparaissant lors de certaines recristallisations. Il est possible qu'il y ait eu une recristallisation lors de l'étape de réticulation topotactique. Cependant il est intéressant de noter que toutes les bactéries observables par le marquage au DAPI sont localisées au sein des taches concentrées d'alginate. En effet, toutes les bactéries observées apparaissent en jaune lors de la fusion des canaux, traduisant une superposition systématique de leur signal avec celui obtenu dans le canal de l'alginate, en rouge. Nous avons alors travaillé avec Jean-François Gilles de l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) sur l'analyse de ces clichés, notamment sur la colocalisation des taches d'alginate avec les bactéries. Les échantillons n'ayant subi aucune étape de fixation et étant en milieux aqueux, l'hypothèse selon laquelle le marquage des bactéries mortes ne devrait pas être observable au microscope confocale, semble raisonnable. En effet, des expériences préliminaires montraient que l'absence de Tween (donc un marquage uniquement des bactéries aux membranes endommagées) ne permettait d'observer qu'un nombre très limité de signal.



**Figure IV-8:** Analyse de colocalisation entre les bactéries et les zones plus fortement concentrées en alginate. (A) Représentation 3D de la zone analysée avec le même code couleur que la **Figure IV-7**. Les résultats sont regroupés dans le graphique (B). La boîte rouge représente le volume des zones concentrées en alginate recouvertes par le volume des bactéries associés, et la jaune, le volume des bactéries colocalisées avec les taches d'alginate. Ces volumes de colocalisation sont représentés en % du volume totale du couple bactérie/alginate pour chaque couple identifié (échelle de gauche). La distance entre le centre de la tâche d'alginate et du centre de la bactérie de chaque couple est aussi représentée, ainsi que la distance entre leur centre et leur bord (échelle de droite). Ces résultats sont issus de l'analyse du cliché par segmentations des différents canaux, permettant un traitement 3D des zones concentrées en alginate (C) et des bactéries marquées par fluorescence (D).

Les analyses ont été réalisées sur un volume de l'échantillon de  $145 \times 145 \times 11 \mu\text{m}^3$  (11  $\mu\text{m}$  de hauteur dans l'axe de progression du front de glace) représenté dans la Figure IV-8 A. Les traitements effectués à l'IBPS sur le logiciel Fiji permettent d'isoler les zones fortement

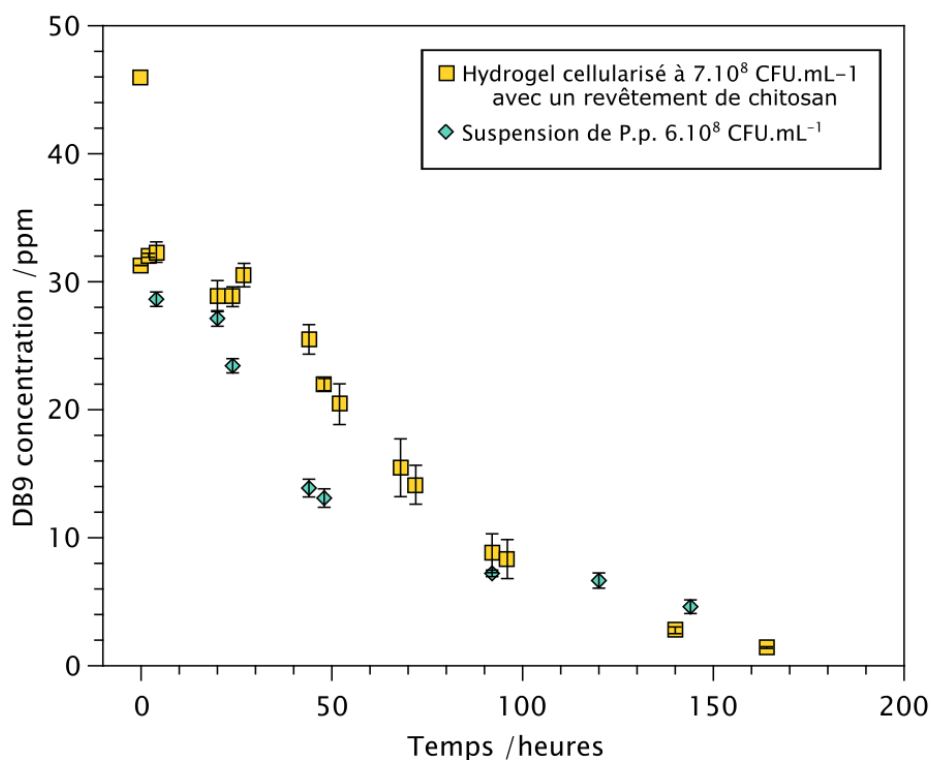
concentrées en alginate (image C) et de comparer leur coordonnées grâce à une analyse de colocalisation avec les *Pseudomonas putida* (image D). Les résultats sont présentés dans le graphique B de la Figure IV-8. On peut voir tout d'abord que chaque bactérie est colocalisée avec une tache d'alginate et que le volume des bactéries recouverte par le polysaccharide marqué est en moyenne de 80%. Les taches d'alginate sont quant à elles recouvertes en moyenne à 50% de leur volume. Ainsi il apparaît clairement que le volume des taches d'alginate est supérieur à celui des bactéries qui sont, elles quasiment entièrement recouvertes. On remarque cependant que le centre des objets analysé est toujours légèrement décalé de 0,5  $\mu\text{m}$ . Il est possible qu'un décalage ait lieu lors de l'acquisition car chaque canal est mesuré sur toute la hauteur de l'échantillon, ce qui peut induire un léger mouvement de l'échantillon et décaler les observations (clairement observé sur d'autres acquisitions). Malgré ce léger décalage, le recouvrement reste important et il semble rationnel de visualiser les bactéries comme étant emprisonnées à l'intérieure des taches d'alginate.

Toutes les taches d'alginate ne sont cependant pas en contact avec des bactéries. Il y a en effet 52 bactéries observées dans l'échantillon contre 522 taches d'alginate dénombrées. Il y aurait donc 10% des zones concentrées en alginate qui contiendraient des *Pseudomonas putida*. Il est intéressant de noter que ce ratio correspond au taux de survie lors de l'étape de réticulation topotactique. De plus si l'on reporte la quantité de bactéries au volume analysé ( $2,27 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ), une concentration de  $2,3 \cdot 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  est obtenue. Ce qui correspond à la quantité de bactéries attendue dans les hydrogels stabilisés par réticulation topotactique. On pourrait alors avancer que l'étape de revêtement par le chitosane n'impacte pas la viabilité, cependant il faut rester vigilant car ces données proviennent d'un volume limité d'un échantillon, et peut ne pas être représentatif. De plus ces données sont basées sur l'hypothèse précédemment évoquée (les bactéries marquées au DAPI sont viables) qui demeure non vérifiée.

Comme exprimé précédemment, il semblerait qu'une recristallisation ait eu lieu. Une hypothèse alors envisageable pour expliquer l'apparition des taches d'alginate serait que lors de la réticulation topotactique, lorsqu'une recristallisation survient, certains cristaux fondent au profit de plus gros (comme présenté aux chapitres précédents) ce qui entraîne une dissolution partielle des murs. Cette solubilisation partielle implique une diminution légère de la concentration en alginate des parois. Il serait alors possible que les bactéries limitent la solubilisation de l'alginate environnant par leur attachement à travers leurs exo-polysaccharides (EPS). En effet, il est reconnu que les bactéries de type *Pseudomonas* possèdent un microenvironnement composé d'EPS, de protéines, de glycoprotéines et de glycopeptides<sup>266</sup>.

Cette capsule naturelle autrefois nommée glycocalyx possède des propriétés essentielles à la survie des bactéries et leur confère notamment une certaine capacité d'adhésion utilisée par ailleurs pour la formation de biofilms<sup>90,267,268</sup>. Ainsi, il est envisageable que l'affinité des EPS des bactéries avec l'alginate des parois, limitent la modification de leur microenvironnement. Un corolaire de l'hypothèse évoqué précédemment, serait que les taches d'alginate alors non colocalisées avec des bactéries structurellement intactes pourraient être colocalisées avec des bactéries endommagées et mortes. Une manière de vérifier ces deux hypothèses serait d'ajouter un chromophore marquant aussi les bactéries mortes tel que l'iodure de propidium afin de mesurer la colocalisation de ces bactéries endommagées et des taches d'alginate (un protocole doit être élaborer pour éviter les biais dus à la présence Tween).

Une partie des échantillons protégés par le revêtement de chitosane ont été utilisés dans des tests de dépollution de DB9. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-9.



**Figure IV-9:** Représentation graphique de la biodégradation du colorant DB9 par des *P.putida* en suspension et encapsulées dans des hydrogels d'alginate structurés possédant un revêtement de chitosane.

Dans l'expérience présentée ici, la capacité de biodégradation de *Pseudomonas putida* encapsulées dans des hydrogels avec un revêtement de chitosane est comparée à celle de



bactéries en suspension dans un milieu minimal pollué. La concentration des deux populations est comparable et est de l'ordre de  $6-7.10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

L'application d'un revêtement de chitosane permet aux matrices de conserver leur morphologie qui ne semblent pas avoir subi de dommage d'un point de vue macroscopique, contrairement aux matrices non enduites présentées précédemment. En effet, malgré la présence de phosphate dans le milieu qui complexe les ions calcium, et qui pourrait donc déstabiliser les matrices d'alginate, le revêtement de chitosane semble protéger de manière acceptable nos hydrogels dans le temps de l'étude. Il y a cependant pour quelques échantillons l'apparition de précipités blanc au bout de 6 jours d'expérience malgré une conservation macroscopique de la forme de l'échantillon ainsi qu'une certaine tenue mécanique (évaluation subjective à la fin de l'expérience). Il est possible que pour ces matrices il y ait des lacunes dans le revêtement et donc une destruction possible d'une partie des murs. Il est aussi possible que certaines parties des parois d'alginate se resolubilisent en présence des ions phosphates, mais que le revêtement de chitosane conserve la structure des matrices grâce à la stabilité des liaisons alginate-chitosane<sup>329,333</sup>. Une manière d'améliorer la protection accordée par le revêtement de chitosane serait d'utiliser un grade d'alginate comprenant plus de groupement G (guluronique) pour permettre une meilleure pénétration des molécules de chitosane, qui devraient par ailleurs être choisies avec de plus petites masses moléculaires<sup>329,333</sup>. La création d'un revêtement comprenant plusieurs couches alternées de polycations et de polyanion est aussi possible pour stabiliser d'avantage les matrices, en limitant drastiquement le relargage des bactéries. Toutefois des analyses seraient nécessaires pour étudier l'impact de ces différentes couches sur la diffusion des nutriments et des polluants, ainsi que sur la viabilité des bactéries encapsulées.

L'utilisation de ces matrices pour la dépollution est représentée en Figure IV-9 où une activité de dépollution est observée. Le spectre d'absorbance du milieu évolue avec le temps montrant une diminution de la quantité de DB9 dans le milieu (dont la concentration est calculée par l'utilisation de la courbe d'étalonnage). De plus l'évolution de la concentration du polluant dans le cas des hydrogels enduits de chitosane semble suivre la même évolution que pour les bactéries libres en suspensions avec un léger décalage rattrapé au bout de 96 heures. La concentration finale de DB9 est similaire dans les deux expériences.

Le revêtement de chitosane ne semble alors pas limiter le potentiel de biodégradation des *P. putida* encapsulées et une dépollution analogue à celle obtenue avec des bactéries libres en suspension est observée. De plus, ce revêtement permet de conserver la structure macroporeuse et organisée de la majorité des matrices lors de leur utilisation, malgré la présence de molécules



complexant le calcium. Ces résultats nécessitent des expériences supplémentaires pour être validés car ils ont été obtenus en fin de thèse en tant qu'expérience exploratoire et n'ont pas encore été reproduites. Ils sont cependant très prometteurs, autant pour le contrôle du relargage et la stabilité des matrices que pour la capacité de dépollution.

### **IV.3 Conclusion**

Dans cette partie de la thèse, nous avons évalué la capacité des *Pseudomonas putida*, en solutions ainsi qu'encapsulées dans les hydrogels – stabilisés par le procédé de réticulation topotactique – à dépolluer des colorant (le DB9, un colorant azoïque).

La capacité de la souche *P. putida*-mt2 à dégrader les colorants azoïques en solution et en condition aérobie a été montrée grâce au suivi d'absorbance des expériences de dépollution et aux analyses chromatographique (HPLC). Cette capacité de dégradation a été conservée après leur encapsulation par congélation directionnelle et la stabilisation par réticulation topotactique. Cependant, ces matrices ont été déstabilisées par les phosphates en solution se complexant avec le  $\text{Ca}^{2+}$  des parois. Une déstructuration des hydrogels ainsi qu'un relargage de bactéries ont été observés.

Un revêtement de chitosane a été appliqué afin de limiter la déstructuration des hydrogels lors de la biodégradation. Des couches homogènes réparties sur les surfaces des parois sont observées permettant une stabilisation en présence des phosphates et une conservation de la structure. Les bactéries encapsulées dans ces hydrogels protégés par la couche de chitosane sont toujours capables de biodégradation de manière analogues aux bactéries en solution.





# **Chapitre V : Conclusion générale**



Cette thèse portait l'ambition d'élaborer un nouveau biomatériau cellularisé pour une application de bioremédiation des eaux usées. Les microorganismes étant la clé de voute de la bioremédiation, la conservation de leur activité métabolique tout au long du procédé de mise en forme et lors de leur utilisation était un paramètre essentiel. Cependant un objectif concomitant était de limiter le relargage des microorganismes exogènes dans le milieu déjà fragilisé par les polluants. La stratégie retenue pour conserver la capacité de biodégradation des bactéries tout en limitant leur dissémination dans l'environnement a été l'encapsulation. La matrice d'encapsulation devait permettre une diffusion optimale des polluant pour assurer leur accessibilité aux bactéries. L'obtention d'une matrice macroporeuse a alors été un des paramètres clé pour le choix du procédé d'encapsulation. De même, la survie des microorganismes lors de la mise en forme a été primordiale. Le piégeage des microorganismes dans une matrice a nécessité l'utilisation d'un matériau biocompatible assurant une stabilité structurelle lors de son utilisation en milieu pollué. Ainsi, au regard de ces contraintes et de ces objectifs, l'alginate a été choisi pour être le composant de la matrice d'encapsulation, et le procédé de congélation directionnelle comme stratégie d'obtention de ces matériaux vivants. En effet, cette combinaison permet l'obtention de matrices macroporeuses composées de parois alignées et biocompatibles. La souche *Pseudomonas putida-mt2* a été choisie pour sa capacité à dégrader les colorants azoïques en condition aérobiques. A ce potentiel de biodégradation s'ajoute le fait qu'elles sont non pathogènes, ce qui assure des conditions expérimentales facilitées et une pertinence accrue pour leur application potentielle.

La première partie du travail expérimental a été focalisée sur le procédé de congélation directionnelle, tant pour sa capacité de structuration des matrices que pour son potentiel d'encapsulation. Le contrôle de la vitesse de progression du front de glace a été la première étape atteinte afin d'obtenir un contrôle sur la morphologie des matrices. En effet, l'obtention d'un front de glace de vitesse constante permet d'instaurer une taille de pores régulière tout au long des matrices. L'influence de la vitesse du front de glace sur l'évolution de la morphologie des pores a été étudiée, et les résultats obtenus coïncident avec ceux reportés dans la littérature. Ainsi lorsque la vitesse du front de glace augmente, l'instabilité de l'interface solution-glace augmente, les cristaux sont alors plus nombreux et leur taille diminue. Les pores des aérogels obtenus après lyophilisation de ces matrices congelées, possèdent alors la même dépendance morphologique à la vitesse de propagation du front de glace : leur taille diminue lorsque cette vitesse augmente.

Les phénomènes advenant lors de la congélation directionnelle ont été étudiés par DSC et par microscopie confocale. Ainsi, lors de la déshydratation subvenant au cours de la ségrégation de phase, une composition critique du mélange concentré entre les cristaux a pu être mise en évidence. Cette fraction volumique de polymère critique, déterminée par l'intersection entre la courbe du *liquidus* et celle de la température de transition vitreuse, permet de fixer la composition limite à partir de laquelle une vitrification du mélange survient. Cependant, le phénomène de transition vitreuse étant éminemment cinétique, l'intersection des deux courbes définissant  $\phi_{crit}$  dépend elle aussi de la vitesse de progression du front de glace. Ainsi, lorsque cette vitesse augmente la  $\phi_{crit}$  diminue mais est atteinte plus rapidement. Ces expériences permettent d'estimer l'évolution du microenvironnement encadrant les bactéries encapsulées.

Le procédé de congélation directionnelle a été employée avec succès pour l'encapsulation de bactéries, piégées dans les parois des matrices d'alginate. De plus, la structure macroporeuse et anisotrope est conservée après l'ajout de *P. putida*. Différentes vitesses de propagation du front de glace ont été expérimentées et des taux de survie compris entre 10 et 20 % ont été obtenus. Les viabilités les plus prometteuses ont été obtenues à la vitesse maximale atteignable avec le montage utilisé, soit  $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . De plus, la viabilité des bactéries est préservée lorsque les matrices cellularisées sont conservées à  $-80^\circ\text{C}$  (jusqu'à un mois). Le procédé de congélation directionnelle est donc efficace pour structurer des matrices macroporeuses et encapsuler des bactéries. Ce procédé possède alors le potentiel pour la formation de matériaux cellularisés pour la biodégradation.

Cependant les matrices cellularisées et congelées nécessitent des étapes supplémentaires de stabilisation en milieux aqueux en vue de l'obtention d'hydrogels cellularisés utilisables pour la biodégradation des eaux usées. Malheureusement la stratégie classique de lyophilisation puis de réticulation aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne une mortalité importante des bactéries encapsulées. Ainsi lors de cette thèse, un nouveau procédé a été mis au point en adaptant une méthode précédemment développée au LCMCP. Ce nouveau procédé, que nous avons nommé réticulation topotactique, permet – en une seule étape – la fonte et le retrait des cristaux de glace ainsi que la conservation de la structure macroporeuse associée, formée lors de la congélation directionnelle. Cette diminution du nombre d'étapes et du temps de réticulation ainsi que la suppression de la lyophilisation a permis d'améliorer significativement la survie des bactéries encapsulées au sein des matrices. De plus aucun cryoprotecteur potentiellement toxique n'est utilisé tout au long des procédés, permettant de s'affranchir des étapes d'addition et de retrait de ces molécules. En effet, l'utilisation de l'alginate comme matrice d'encapsulation – grâce

son action de cryo-protection extracellulaire<sup>243,248,307</sup> et à sa capacité de maintien de l'hydratation – permet l'amélioration significative du taux de survie bactérienne durant l'étape de congélation directionnelle et de réticulation topotactique.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une vitesse de progression du front de glace de  $50 \mu\text{m.s}^{-1}$  et une concentration de  $1,5 \cdot 10^9 \text{ CFU.mL}^{-1}$ . Une proportion encourageante de bactéries est ainsi maintenue vivante dans les parois de ces hydrogels structurés et macroporeux, prêtes à être utilisées pour des applications de biodégradation.

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons évalué la capacité des *Pseudomonas putida* en suspension, ainsi qu'encapsulées dans les hydrogels, à dépolluer un colorant azoïque (DB9). La capacité de la souche *P. putida*-mt2 à dégrader les colorants azoïques en solution et en condition aérobie a été montrée grâce au suivi d'absorbance des expériences de dépollution et aux analyses chromatographique (HPLC). Cette capacité de dégradation a été conservée après leur encapsulation par congélation directionnelle et la stabilisation par réticulation topotactique. Cependant, ces hydrogels ont été déstabilisés par les phosphates en solution se complexant avec le  $\text{Ca}^{2+}$  des parois. Une déstructuration des hydrogels ainsi qu'un relargage de bactéries ont été observés. Un revêtement de chitosane a été appliqué afin de limiter la déstructuration des hydrogels lors de la biodégradation. Des couches continues et homogènes de chitosane, réparties sur les surfaces des parois, permettent une stabilisation des hydrogels en présence des phosphates et donc une conservation de la structure des matériaux pendant l'activité de biodégradation. Les bactéries encapsulées dans ces hydrogels, protégées par la couche de chitosane, possèdent une capacité de biodégradation analogue aux bactéries en solution.

L'élaboration d'une matrice cellularisée, macroporeuse, stable en milieu aqueux et capable de biodégradation a été rendu possible lors de cette thèse. Bien que de nombreuses questions et hypothèses restent en suspens, la preuve de concept établie ici est prometteuse et ouvre la voie à de nouveaux biomatériaux pour la bioremédiation à travers une technique de structuration cryogénique et des méthodes de stabilisations innovantes. Au-delà de l'application de ces matériaux dans le contexte de la bioremédiation, les techniques d'encapsulation de microorganismes et de stabilisation topotactique permettent d'envisager une panoplie d'autres innovations dans des domaines alimentaire, pharmaceutique et biomédical.





# Annexes

## Communications

Publications :

- Qin, K.; Eschenbrenner, C.; Ginot, F.; Dedovets, D.; Coradin, T.; Deville, S.; Fernandes, F. M.: Unveiling Cells' Local Environment during Cryopreservation by Correlative in Situ Spatial and Thermal Analyses. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11* (18), 7730–7738. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c01729>.
- Eschenbrenner, C.; Qin, K.; Tyagi, S.; Deville, S.; Fernandes, F.M. : Freeze casting as a technique to enhance the encapsulation of bacteria for biodegradation applications, *en préparation* 2022.
- Eschenbrenner, C.; Alonso, L.; Fernandes, F.M.: Topotactic cross-linking as a new universal stabilization process of frozen materials, *en préparation* 2022.

Conférences :

- Présentation orale, International N.I.C.E conference, Biotech, Nice France 2020 (visioconférence due aux conditions sanitaires)
- Session poster, International Nature conference, Sustainable Solutions for Pollution Control, 2021 (visioconférence)
- Présentation orale aux journées de l'ED (école doctorale), prix du jury pour la présentation

## Calcul bactéries

Le calcul de la fraction volumique représentée par les bactéries au sein de la solution d'alginate est calculé de la manière suivante :

$$\phi_{P.p.} = \frac{[P.p.] \pi r^2 h \rho}{[Alg]}$$

Où  $[P.p.]$  représente la concentration des bactéries (en CFU.mL<sup>-1</sup>),  $[Alg]$  la concentration d'alginate. L'expression «  $r^2 h \rho$  » caractérise les *P.putida* et représente leurs dimensions et densité. Ainsi  $r$  est fixé à 0,5  $\mu\text{m}$  et  $h$  à 1  $\mu\text{m}$ . Une approximation de leur masse volumique est fixée pour le calcul à  $1,1 \cdot 10^{-12} \text{ g} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ .

## **Protocole de fonctionnalisation de l'alginate par l'isothiocyanate de fluorescéine :**

Préparer 1L de solution tampon de carbonate à pH 9,3 avec de l'alginate :

- Bicarbonate de sodium (P.M. = 84.01 g/mol) m=3,587 g
- Carbonate de sodium (P.M. = 105.99 g/mol) m=0,774 g

Ajouter de l'alginate pour atteindre une concentration de 10 g/L (soit 10 g). Laisser homogénéiser sous agitation magnétique à température ambiante. Séparément, rajouter 1 mg de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pour arriver à à 1 mL de N,N-diméthylformamide (DMF) et homogénéiser. Mélanger les deux solutions et laisser agiter toute une nuit à température ambiante. La solution est ensuite dialysée contre de l'eau ultrapure dans des boudins de membrane MWCO 3500

- 2 à 3 dialyses de 2 heures (jusqu'à ce que la solution de lavage soit incolore)
- Suivie de 2 dialyses d'au moins une nuit

Les échantillons sont ensuite congelés et lyophilisés pour conservation.

## **Fixation des échantillons en résine pour observation TEM**

### Jour 0

Fixer les échantillons en PFA à 4°C sur une nuit et les découper, idéalement en parallélépipèdes 1 \* 1\* 5 mm de long (pour être mis dans axe de l'alvéole).

### Jour 1

Pour la préparation des solutions, prévoir un volume de 2mL par salière. Rincer 3 x 10 min en tampon cacodylate 0.1M/saccharose 0.6M. Fixer les échantillons dans du glutaraldéhyde 8% + tampon cacodylate 0.05M en proportions 1:2,2 pendant 2h à 4°C. Rincer 3 x 10 min en tampon cacodylate 0.1M/saccharose 0.6M (1:1). Incuber pendant 1h dans la solution de rouge nucléaire (rouge nucléaire solide 0.1g, sulfate d'aluminium 5g, eau distillée 100mL) à température ambiante. Rincer 3 x 10 min en tampon cacodylate 0.1M/saccharose 0.6M (1:1). Rincer 30 min en éthanol 50%. Introduire les échantillons dans un bain d'éthanol 70% sur la nuit à 4°C en gardant les salières couvertes et filmées.

### Jour 2

Bains de déshydratation : 10 min alcool 70%, 30 min alcool 95%, 10 min alcool 100%, 15 min alcool 100%. Puis 30 min oxyde de propylène / alcool 100% (1:1). Bain mixte 1/4 résine 3/4 oxyde de propylène pendant 2h (*recette résine ci-dessous*). Bain mixte 1/2 résine 1/2 oxyde de propylène sur la nuit (4°C - salières couvertes et filmées).

Préparation de la résine : Mélanger 20 ml d'araldite, 22 ml de durcisseur DDSA et 1,1 ml d'accélérateur BDMA. Dégazer la résine une première fois dans un bécher pendant au moins 30 min sous vide.

### Jour 3

Introduire les échantillons dans un bain mixte de résine et oxyde de propylène (3 :1) pendant 2h. Introduire les échantillons dans un bain de résine pure sur la demi-journée : utiliser la résine déjà dégazée extensivement une fois, ajouter dans les salières en présence des échantillons, et faire un deuxième dégazage (environ 15 mn à 30 mn : il ne doit plus apparaître de bulles pendant plusieurs minutes). Introduire les échantillons dans un nouveau bain de résine dégazée sur la nuit (4°C – salières couvertes et filmées)

### Jour 4

Bain de résine neuve sur la matinée, faire un troisième dégazage des salières.

Inclusion des échantillons dans les moules avec une résine neuve : verser les 2/3 du volume du moule en résine à la seringue, placer l'échantillon contre le bord biseauté, et compléter le volume du moule avec la résine. Faire un quatrième dégazage de la résine dans les moules.

Mettre à l'étuve à 60°C pendant 3 jours.

## **Protocole de fonctionnalisation du chitosan avec la rhodamine isothiocyanate :**

Solubiliser 1 g de chitosan dans 1 L d'une solution d'HCl à 0,6%. Le pH est ensuite augmenté à l'aide d'une solution de NaOH à 0,5 mol.L<sup>-1</sup> jusqu'à pH 10. Une solution de 5 mg de rhodamine isothiocyanate dans 10 mL d'éthanol est préparée. Les deux solutions sont mélangées et laissées à agiter toute une nuit à température ambiante à l'abri de la lumière.

La solution est ensuite centrifugée (20000 RPM) pendant 30 min 2 fois et enlevant le surnageant et en redispersant les culots dans une solution de tampon carbonate pH 9,3 – solution de 1 L contenant du bicarbonate de sodium et du carbonate de sodium – jusqu'à obtenir un

surageant limpide. Les échantillons sont congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  et lyophilisés pour obtenir une poudre de chitosan fonctionnalisée.



## Chapitre VI : Bibliographie

- (1) Cassidy, M. B.; Lee, H.; Trevors, J. T. Environmental Applications of Immobilized Microbial Cells: A Review. *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *16* (2), 79–101. <https://doi.org/10.1007/BF01570068>.
- (2) de-Bashan, L. E.; Bashan, Y. Immobilized Microalgae for Removing Pollutants: Review of Practical Aspects. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (6), 1611–1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>.
- (3) Valdivia-Rivera, S.; Ayora-Talavera, T.; Lizardi-Jiménez, M. A.; García-Cruz, U.; Cuevas-Bernardino, J. C.; Pacheco, N. Encapsulation of Microorganisms for Bioremediation: Techniques and Carriers. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2021**, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09577-x>.
- (4) Christoph, S.; Kwiatoszynski, J.; Coradin, T.; Fernandes, F. M. Cellularized Cellular Solids via Freeze-Casting. *Macromol. Biosci.* **2016**, *16* (2), 182–187. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500319>.
- (5) Signals, E. E. A. *Towards Zero Pollution in Europe*; 2020. <https://doi.org/10.2800/40627>.
- (6) European Environment Agency. *State of Europe's Seas. EEA Report No 2/2015*; 2015.
- (7) EEA. European waters getting cleaner, but big challenges remain <https://www.eea.europa.eu/highlights/european-waters-getting-cleaner-but> (accessed Aug 20, 2007).
- (8) European Environment Agency. *Towards Zero Pollution in Europe*; 2020. <https://doi.org/10.2800/40627>.
- (9) European Environment Agency. *Climate Change and Water — Warmer Oceans, Flooding and Droughts*; 2018. <https://doi.org/10.2800/52469>.
- (10) Pilon-Smits, E. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>.
- (11) Khalid, A.; Zubair, M.; Ihsanullah. A Comparative Study on the Adsorption of Eriochrome Black T Dye from Aqueous Solution on Graphene and Acid-Modified Graphene. *Arab. J. Sci. Eng.* **2018**, *43* (5), 2167–2179. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2543-x>.
- (12) Zubair, M.; Jarrah, N.; Ihsanullah; Khalid, A.; Manzar, M. S.; Kazeem, T. S.; Al-Harathi, M. A. Starch-NiFe-Layered Double Hydroxide Composites: Efficient Removal of Methyl Orange from Aqueous Phase. *J. Mol. Liq.* **2018**, *249*, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.022>.
- (13) Chong, M. Y.; Tam, Y. J. Bioremediation of Dyes Using Coconut Parts via Adsorption: A Review. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2* (2), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-1978-y>.
- (14) Ahlawat, W.; Kataria, N.; Dilbaghi, N.; Hassan, A. A.; Kumar, S.; Kim, K. H. Carbonaceous Nanomaterials as Effective and Efficient Platforms for Removal of Dyes from Aqueous Systems. *Environ. Res.* **2020**, *181* (October 2019), 108904. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108904>.
- (15) RAGHUKUMAR, C. Fungi from Marine Habitats : An Application in Bioremediation 1. *Mycol. Res.* **2000**, *104* (October), 1222–1226.
- (16) Vikrant, K.; Giri, B. S.; Raza, N.; Roy, K.; Kim, K. H.; Rai, B. N.; Singh, R. S. Recent Advancements in Bioremediation of Dye: Current Status and Challenges. *Bioresour. Technol.* **2018**, *253* (January), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.029>.
- (17) Rauf, M. A.; Salman Ashraf, S. Survey of Recent Trends in Biochemically Assisted Degradation of Dyes. *Chem. Eng. J.* **2012**, *209*, 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.015>.
- (18) Forgacs, E.; Cserháti, T.; Oros, G. Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: A Review.

- Environ. Int.* **2004**, *30* (7), 953–971. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.001>.
- (19) Yagub, M. T.; Sen, T. K.; Afroze, S.; Ang, H. M. Dye and Its Removal from Aqueous Solution by Adsorption: A Review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *209*, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.002>.
  - (20) Robinson, T.; McMullan, G.; Marchant, R.; Nigam, P. Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. *Bioresour. Technol.* **2001**, *77*, 247–255. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2004.004190>.
  - (21) ZOLLINGER, H. Color Chemistry-Synthesis, Properties and Application of Organic Dyes and Pigments. *VCH Publ. New York* **1987**, 85–87.
  - (22) Padhiyar, H.; Thanki, A.; Kumar Singh, N.; Pandey, S.; Yadav, M.; Chand Yadav, T. Parametric and Kinetic Investigations on Segregated and Mixed Textile Effluent Streams Using Moringa Oleifera Seed Powders of Different Sizes. *J. Water Process Eng.* **2020**, *34* (September 2019), 101159. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101159>.
  - (23) Sarker, M.; Shin, S.; Jeong, J. H.; Jhung, S. H. Mesoporous Metal-Organic Framework PCN-222(Fe): Promising Adsorbent for Removal of Big Anionic and Cationic Dyes from Water. *Chem. Eng. J.* **2019**, *371* (April), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.039>.
  - (24) Lellis, B.; Fávoro-Polonio, C. Z.; Pamphile, J. A.; Polonio, J. C. Effects of Textile Dyes on Health and the Environment and Bioremediation Potential of Living Organisms. *Biotechnol. Res. Innov.* **2019**, *3* (2), 275–290. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>.
  - (25) Annuar, M. S. M.; Adnan, S.; Vikineswary, S.; Chisti, Y. Kinetics and Energetics of Azo Dye Decolorization by *Pycnoporus Sanguineus*. *Water. Air. Soil Pollut.* **2009**, *202* (1–4), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9968-5>.
  - (26) King, R. B.; Lon, G. M.; Sheldon, J. K. Practical Environmental Bioremediation: The Field Guide. Second Edition. **1998**.
  - (27) Khan, S.; Malik, A. Toxicity Evaluation of Textile Effluents and Role of Native Soil Bacterium in Biodegradation of a Textile Dye. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25* (5), 4446–4458. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0783-7>.
  - (28) Giovanella, P.; Vieira, G. A. L.; Ramos Otero, I. V.; Pais Pellizzer, E.; de Jesus Fontes, B.; Sette, L. D. Metal and Organic Pollutants Bioremediation by Extremophile Microorganisms. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *382* (January 2019), 121024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>.
  - (29) Bardi, L.; Marzona, M. Factors Affecting the Complete Mineralization of Azo Dyes. **2010**, *60*, 195–210. [https://doi.org/10.1007/698\\_2009\\_50](https://doi.org/10.1007/698_2009_50).
  - (30) Brüscheiler, B. J.; Merlot, C. Azo Dyes in Clothing Textiles Can Be Cleaved into a Series of Mutagenic Aromatic Amines Which Are Not Regulated Yet. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *88*, 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.06.012>.
  - (31) Sakshi; Haritash, A. K. A Comprehensive Review of Metabolic and Genomic Aspects of PAH-Degradation. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202* (8), 2033–2058. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01929-5>.
  - (32) CLU-IN, E. A Citizen’s Guide to Cleanup Technologies <https://clu-in.org/products/citguide/> (accessed Jul 20, 2021).
  - (33) Ahmad, A.; Mohd-Setapar, S. H.; Chuong, C. S.; Khatoun, A.; Wani, W. A.; Kumar, R.; Rafatullah, M. Recent Advances in New Generation Dye Removal Technologies: Novel Search for Approaches to Reprocess Wastewater. *RSC Adv.* **2015**, *5* (39), 30801–30818. <https://doi.org/10.1039/c4ra16959j>.
  - (34) Liu, J.; Wang, Z.; Li, H.; Hu, C.; Raymer, P.; Huang, Q. Effect of Solid State Fermentation of Peanut Shell on Its Dye Adsorption Performance. *Bioresour. Technol.* **2018**, *249* (October 2017), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.010>.



- (35) Ali, I.; Burakova, I.; Galunin, E.; Burakov, A.; Mkrtychyan, E.; Melezhik, A.; Kurnosov, D.; Tkachev, A.; Grachev, V. High-Speed and High-Capacity Removal of Methyl Orange and Malachite Green in Water Using Newly Developed Mesoporous Carbon: Kinetic and Isotherm Studies. *ACS Omega* **2019**, *4* (21), 19293–19306. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02669>.
- (36) Blaisi, N. I.; Zubair, M.; Ihsanullah; Ali, S.; Kazeem, T. S.; Manzar, M. S.; Al-Kutti, W.; Al Harthi, M. A. Date Palm Ash-MgAl-Layered Double Hydroxide Composite: Sustainable Adsorbent for Effective Removal of Methyl Orange and Eriochrome Black-T from Aqueous Phase. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25* (34), 34319–34331. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3367-2>.
- (37) Dil, E. A.; Ghaedi, M.; Ghaedi, A. M.; Asfaram, A.; Goudarzi, A.; Hajati, S.; Soylak, M.; Agarwal, S.; Gupta, V. K. Modeling of Quaternary Dyes Adsorption onto ZnO-NR-AC Artificial Neural Network: Analysis by Derivative Spectrophotometry. *J. Ind. Eng. Chem.* **2016**, *34*, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.11.010>.
- (38) Huang, X.; Bo, X.; Zhao, Y.; Gao, B.; Wang, Y.; Sun, S.; Yue, Q.; Li, Q. Effects of Compound Biofloculant on Coagulation Performance and Floc Properties for Dye Removal. *Bioresour. Technol.* **2014**, *165* (C), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.125>.
- (39) Pan, Y.; Wang, Y.; Zhou, A.; Wang, A.; Wu, Z.; Lv, L.; Li, X.; Zhang, K.; Zhu, T. Removal of Azo Dye in an Up-Flow Membrane-Less Bioelectrochemical System Integrated with Bio-Contact Oxidation Reactor. *Chem. Eng. J.* **2017**, *326*, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.05.146>.
- (40) Tay, M. F.; Liu, C.; Cornelissen, E. R.; Wu, B.; Chong, T. H. The Feasibility of Nanofiltration Membrane Bioreactor (NF-MBR)+reverse Osmosis (RO) Process for Water Reclamation: Comparison with Ultrafiltration Membrane Bioreactor (UF-MBR)+RO Process. *Water Res.* **2018**, *129*, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.013>.
- (41) Van der Bruggen, B. *Microfiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration, Reverse Osmosis, and Forward Osmosis*; Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813483-2.00002-2>.
- (42) Chollom, M. N.; Rathilal, S.; Pillay, V. L.; Alfa, D. The Applicability of Nanofiltration for the Treatment and Reuse of Textile Reactive Dye Effluent. *Water SA* **2015**, *41* (3), 398–405. <https://doi.org/10.4314/wsa.v41i3.12>.
- (43) Rondon, H.; El-Cheikh, W.; Boluarte, I. A. R.; Chang, C. Y.; Bagshaw, S.; Farago, L.; Jegatheesan, V.; Shu, L. Application of Enhanced Membrane Bioreactor (EMBR) to Treat Dye Wastewater. *Bioresour. Technol.* **2015**, *183*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.110>.
- (44) Pandey, A.; Singh, P.; Iyengar, L. Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, *59* (2), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.08.006>.
- (45) Verma, P.; Madamwar, D. Decolourization of Synthetic Dyes by a Newly Isolated Strain of *Serratia Marcescens*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *19* (6), 615–618. <https://doi.org/10.1023/A:1025115801331>.
- (46) Jirasripongpun, K.; Nasanit, R.; Chotikasatian, B.; Niruntasook, J. Decolorization and Degradation of CI Reactive Red 195 by *Enterobacter* Sp. *Thammasat Int. J. Sci. Technol.* **2007**, *12*, 6–11.
- (47) Ali, H. Biodegradation of Synthetic Dyes - A Review. *Water. Air. Soil Pollut.* **2010**, *213* (1–4), 251–273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>.
- (48) Zhou, W.; Zimmermann, W. Decolorization of Industrial Effluents Containing Reactive Dyes by Actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *107* (2–3), 157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06023.x>.
- (49) Chander, M.; Arora, D. S. Evaluation of Some White-Rot Fungi for Their Potential to Decolourise Industrial Dyes. *Dye. Pigment.* **2007**, *72* (2), 192–198.

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.08.023>.

- (50) Yao, Z.; Li, J.; Xie, H.; Yu, C. Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environ. Sci.* **2012**, *16*, 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.099>.
- (51) Salt, D. E.; Blaylock, M.; Kumar, N. P. B. A.; Dushenkov, V.; Ensley, B. D.; Chet, I.; Raskin, I. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Bio/Technology* **1995**, *13* (5), 468–474. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>.
- (52) Ron, E. Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and Oil Bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (3), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6).
- (53) Anjum, R.; Rahman, M.; Masood, F.; Malik, A. Environmental Protection Strategies for Sustainability. *Springer Netherlands* **2012**, (eds. Mali, 295–328).
- (54) Kaushik, P.; Malik, A. Fungal Dye Decolourization: Recent Advances and Future Potential. *Environ. Int.* **2009**, *35* (1), 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.05.010>.
- (55) Saratale, R. G.; Saratale, G. D.; Chang, J. S.; Govindwar, S. P. Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes: A Review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2011**, *42* (1), 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.06.006>.
- (56) Phale, P. S.; Mahajan, M. C.; Vaidyanathan, C. S. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Indian Inst. Sci.* **1997**, *77* (2), 141–174. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1672-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1672-5_16).
- (57) Juwarkar, A. A.; Singh, S. K.; Mudhoo, A. A Comprehensive Overview of Elements in Bioremediation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2010**, *9* (3), 215–288. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9215-6>.
- (58) Lasat, M. M. Phytoextraction of Metals from Contaminated Soil: A Review of Plant/Soil/Metal Interaction and Assessment of Pertinent Agronomic Issues. *J. Hazard. Subst. Res.* **1999**, *2* (1), 1–25. <https://doi.org/10.4148/1090-7025.1015>.
- (59) Hutchinson, S. L.; Schwab, A. P.; Banks, M. K. *Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in the Rhizosphere*; 2004; Vol. 1. <https://doi.org/10.1002/047127304x.ch11>.
- (60) Olson, P. E.; Reardon, K. F.; Pilon-Smits, E. A. H. *Ecology of Rhizosphere Bioremediation*; 2004; Vol. 1. <https://doi.org/10.1002/047127304x.ch10>.
- (61) Salt, D. E.; Smith, R. D.; Raskin, I. PHYTOREMEDIATION. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 129–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>.
- (62) Fletcher, J.; Hegde, R. Release of Phenols by Perennial Plant Roots and Their Potential Importance in Bioremediation. *Chemosphere* **1995**, *31*, 3009–3016.
- (63) Leigh, M. B.; Fletcher, J. S.; Fu, X.; Schmitz, F. J. Root Turnover: An Important Source of Microbial Substrates in Rhizosphere Remediation of Recalcitrant Contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36* (7), 1579–1583. <https://doi.org/10.1021/es015702i>.
- (64) Ihsanullah, I.; Jamal, A.; Ilyas, M.; Zubair, M.; Khan, G.; Atieh, M. A. Bioremediation of Dyes: Current Status and Prospects. *J. Water Process Eng.* **2020**, *38* (June), 101680. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101680>.
- (65) Perales-Vela, H. V.; Peña-Castro, J. M.; Cañizares-Villanueva, R. O. Heavy Metal Detoxification in Eukaryotic Microalgae. *Chemosphere* **2006**, *64* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>.
- (66) Wang, J.; Chen, C. Biosorption of Heavy Metals by *Saccharomyces Cerevisiae*: A Review. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24* (5), 427–451. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>.
- (67) Lim, S. L.; Chu, W. L.; Phang, S. M. Use of *Chlorella Vulgaris* for Bioremediation of Textile Wastewater. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (19), 7314–7322.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.092>.

- (68) Johnsen, A. R.; Wick, L. Y.; Harms, H. Principles of Microbial PAH-Degradation in Soil. *Environ. Pollut.* **2005**, *133* (1), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>.
- (69) Sheehan, D. Bioremediation Protocols. *Humana Press Inc* **1997**, 68–70.
- (70) Fu, P.; Secundo, F. Algae and Their Bacterial Consortia for Soil Bioremediation. *Chem. Eng. Trans.* **2016**, *49* (April), 427–432. <https://doi.org/10.3303/CET1649072>.
- (71) Blázquez, A.; Rodríguez, J.; Brissos, V.; Mendes, S.; Martins, L. O.; Ball, A. S.; Arias, M. E.; Hernández, M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes Using a Versatile Streptomyces Laccase-Natural Mediator System. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26* (5), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.020>.
- (72) Glick, B. R. Phytoremediation: Synergistic Use of Plants and Bacteria to Clean up the Environment. *Biotechnol. Adv.* **2003**, *21* (5), 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00055-7).
- (73) Mulligan, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. *Environ. Pollut.* **2005**, *133* (2), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
- (74) Vikrant, K.; Giri, B. S.; Raza, N.; Roy, K.; Kim, K. H.; Rai, B. N.; Singh, R. S. Recent Advancements in Bioremediation of Dye: Current Status and Challenges. *Bioresour. Technol.* **2018**, *253* (January), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.029>.
- (75) Wang, H.; Zheng, X. W.; Su, J. Q.; Tian, Y.; Xiong, X. J.; Zheng, T. L. Biological Decolorization of the Reactive Dyes Reactive Black 5 by a Novel Isolated Bacterial Strain Enterobacter Sp. EC3. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *171* (1–3), 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.050>.
- (76) Saratale, R. G.; Saratale, G. D.; Kalyani, D. C.; Chang, J. S.; Govindwar, S. P. Enhanced Decolorization and Biodegradation of Textile Azo Dye Scarlet R by Using Developed Microbial Consortium-GR. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (9), 2493–2500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.013>.
- (77) Yang, X. Q.; Zhao, X. X.; Liu, C. Y.; Zheng, Y.; Qian, S. J. Decolorization of Azo, Triphenylmethane and Anthraquinone Dyes by a Newly Isolated Trametes Sp. SQ01 and Its Laccase. *Process Biochem.* **2009**, *44* (10), 1185–1189. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.015>.
- (78) Azubuiké, C. C.; Chikere, C. B.; Okpokwasili, G. C. Bioremediation Techniques—Classification Based on Site of Application: Principles, Advantages, Limitations and Prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *32* (11). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.
- (79) Article, O. R.; Vidyamandira, R. M.; Math, B.; Bengal, W. EX SITU BIOREMEDIATION - AN OVERVIEW. **2018**, *4* (422), 422–437. <https://doi.org/10.26479/2018.0406.34>.
- (80) Dervakos, G. A.; Webb, C. On the Merits of Viable-Cell Immobilisation. *Biotechnol. Adv.* **1991**, *9* (4), 559–612. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90733-C](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90733-C).
- (81) Simó, G.; Fernández-Fernández, E.; Vila-Crespo, J.; Ruipérez, V.; Rodríguez-Nogales, J. M. Research Progress in Coating Techniques of Alginate Gel Polymer for Cell Encapsulation. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *170*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.013>.
- (82) Wandrey, C. Why Immobilize? *Prog. Biotechnol.* **1996**, *11* (C), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80003-7](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80003-7).
- (83) Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N.; Chibata, I. Studies on Continuous Enzyme Reactions. I. Screening of Carriers for Preparation of Water-Insoluble Aminoacylase. *Enzymologia* **1966**, *4*, 214–224.
- (84) Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>.

- (85) Berillo, D.; Al-Jwaid, A.; Caplin, J. Polymeric Materials Used for Immobilisation of Bacteria for the Bioremediation of Contaminants in Water. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13* (7). <https://doi.org/10.3390/polym13071073>.
- (86) Wang, F.; Guo, C.; Liu, H.-Z.; Liu, C.-Z. Immobilization of *Pycnoporus Sanguineus* Laccase by Metal Affinity Adsorption on Magnetic Chelator Particles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *83*, 97–104. <https://doi.org/10.1002/jctb.1793>.
- (87) Bayat, Z.; Hassanshahian, M.; Cappello, S. Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review. *Open Microbiol. J.* **2015**, *9*, 48–54. <https://doi.org/10.2174/1874285801509010048>.
- (88) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption* **2014**, *20* (5–6), 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.
- (89) Suzana, C. u dia S. M.; Claudia, M.; a, M.; Larissa Guedes Fiuacute za, M. C. o; ra, T. dde S. Immobilization of Microbial Cells: A Promising Tool for Treatment of Toxic Pollutants in Industrial Wastewater. *African J. Biotechnol.* **2013**, *12* (28), 4412–4418. <https://doi.org/10.5897/ajb12.2677>.
- (90) Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15* (2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
- (91) Kilonzo, P.; Margaritis, A.; Bergougnou, M. Airlift-Driven Fibrous-Bed Bioreactor for Continuous Production of Glucoamylase Using Immobilized Recombinant Yeast Cells. *J. Biotechnol.* **2009**, *143* (1), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.007>.
- (92) Reddy, N.; Reddy, R.; Jiang, Q. Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33* (6), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>.
- (93) Bouabidi, Z. B.; El-Naas, M. H.; Zhang, Z. Immobilization of Microbial Cells for the Biotreatment of Wastewater: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17* (1), 241–257. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0795-7>.
- (94) Garmroodi, M.; Mohammadi, M.; Ramazani, A.; Ashjari, M.; Mohammadi, J.; Sabour, B.; Yousefi, M. Covalent Binding of Hyper-Activated Rhizomucor Miehei Lipase (RML) on Hetero-Functionalized Siliceous Supports. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *86*, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.076>.
- (95) Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X. Novel and Efficient Method for Immobilization and Stabilization of  $\beta$ -d-Galactosidase by Covalent Attachment onto Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Chitosan Nanoparticles. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *61* (3–4), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.07.003>.
- (96) Xia, T.; Guan, Y.; Yang, M.; Xiong, W.; Wang, N.; Zhao, S.; Guo, C. Synthesis of Polyethylenimine Modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles with Immobilized Cu<sup>2+</sup> for Highly Efficient Proteins Adsorption. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *443*, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.026>.
- (97) Fürst, W.; Banerjee, A. Release of Glutaraldehyde from an Albumin-Glutaraldehyde Tissue Adhesive Causes Significant In Vitro and In Vivo Toxicity. *Ann. Thorac. Surg.* **2005**, *79* (5), 1522–1528. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.11.054>.
- (98) Desai, K. G. H.; Park, H. J. *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*; 2005; Vol. 23. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>.
- (99) Park, J. H.; Hong, D.; Lee, J.; Choi, I. S. Cell-in-Shell Hybrids: Chemical Nanoencapsulation of Individual Cells. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (5), 792–800. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00087>.
- (100) Carturan, G.; Campostrini, R.; Diré, S.; Scardi, V.; De Alteriis, E. Inorganic Gels for Immobilization of Biocatalysts: Inclusion of Invertase-Active Whole Cells of Yeast

- (*Saccharomyces Cerevisiae*) into Thin Layers of SiO<sub>2</sub> Gel Deposited on Glass Sheets. *J. Mol. Catal.* **1989**, *57* (1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(89\)80121-X](https://doi.org/10.1016/0304-5102(89)80121-X).
- (101) Weiser, D.; Sóti, P. L.; Bánóczy, G.; Bódai, V.; Kiss, B.; Gellért, Á.; Nagy, Z. K.; Koczka, B.; Szilágyi, A.; Marosi, G.; Poppe, L. Bioimprinted Lipases in PVA Nanofibers as Efficient Immobilized Biocatalysts. *Tetrahedron* **2016**, *72* (46), 7335–7342. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.06.027>.
- (102) Nassif, N.; Bouvet, O.; Rager, M. N.; Roux, C.; Coradin, T.; Livage, J. Living Bacteria in Silica Gels. *Nat. Mater.* **2002**, *1* (1), 42–44. <https://doi.org/10.1038/nmat709>.
- (103) Christoph, S. Elaboration of Cellularized Hybrid Macroporous Materials by Freeze-Casting for Soil Bioremediation, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. <https://doi.org/2017PA066133> HAL Id : tel-01746073.
- (104) Yoetz-Kopelman, T.; Dror, Y.; Shacham-Diamand, Y.; Freeman, A. “Cells-on-Beads”: A Novel Immobilization Approach for the Construction of Whole-Cell Amperometric Biosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *232*, 758–764. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.132>.
- (105) Ray, S.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R. An Overview of Encapsulation of Active Compounds Used in Food Products by Drying Technology. *Food Biosci.* **2016**, *13*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>.
- (106) Mallick, N. Biotechnological Potential of Immobilized Algae for Wastewater N, P and Metal Removal: A Review. *BioMetals* **2002**, *15* (4), 377–390. <https://doi.org/10.1023/A:1020238520948>.
- (107) Perullini, M.; Jobbágy, M.; Mouso, N.; Forchiassin, F.; Bilmes, S. A. Silica-Alginate-Fungi Biocomposites for Remediation of Polluted Water. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (31), 6479–6483. <https://doi.org/10.1039/c0jm01144d>.
- (108) Klein, S.; Avrahami, R.; Zussman, E.; Beliaevski, M.; Tarre, S.; Green, M. Encapsulation of *Pseudomonas* Sp. ADP Cells in Electrospun Microtubes for Atrazine Bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39* (11), 1605–1613. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1164-3>.
- (109) Chen, J. P.; Lin, Y. S. Decolorization of Azo Dye by Immobilized *Pseudomonas Luteola* Entrapped in Alginate-Silicate Sol-Gel Beads. *Process Biochem.* **2007**, *42* (6), 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.001>.
- (110) Cao, L.; van Langen, L.; Sheldon, R. A. Immobilised Enzymes: Carrier-Bound or Carrier-Free? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14* (4), 387–394. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00096-X).
- (111) Quiococho, F.; Richards, F. Intermolecular Cross-Linking of a Protein in the Rystalline State: Carboxypeptidase-A. *Biochemistry* **1964**, *52*, 833–839.
- (112) Roy, J. J.; Abraham, T. E. Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (9), 3705–3721. <https://doi.org/10.1021/cr0204707>.
- (113) Guisan, J.; Bolivar, J.; Lopez-gallego, F.; Rocha-Martinn, J. *Immobilization of Enzymes and Cells*; Humana, Ed.; Springer Science, 1997.
- (114) Ayala, M.; Horjales, E.; Pickard, M. A.; Vazquez-Duhalt, R. Cross-Linked Crystals of Chloroperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295* (4), 828–831. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00766-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00766-0).
- (115) Zaushitsyna, O.; Berillo, D.; Kirsebom, H.; Mattiasson, B. Cryostructured and Crosslinked Viable Cells Forming Monoliths Suitable for Bioreactor Applications. *Top. Catal.* **2014**, *57* (5), 339–348. <https://doi.org/10.1007/s11244-013-0189-9>.
- (116) Kirsebom, H.; Mattiasson, B.; Galaev, I. Y. Building Macroporous Materials from Microgels and Microbes via One-Step Cryogelation. *Langmuir* **2009**, *25* (15), 8462–8465. <https://doi.org/10.1021/la9006857>.

- (117) Al-Jwaid, A. K.; Berillo, D.; Savina, I. N.; Cundy, A. B.; Caplin, J. L. One-Step Formation of Three-Dimensional Macroporous Bacterial Sponges as a Novel Approach for the Preparation of Bioreactors for Bioremediation and Green Treatment of Water. *RSC Adv.* **2018**, *8* (54), 30813–30824. <https://doi.org/10.1039/C8RA04219E>.
- (118) Aragão Börner, R.; Zaushitsyna, O.; Berillo, D.; Scaccia, N.; Mattiasson, B.; Kirsebom, H. Immobilization of *Clostridium Acetobutylicum* DSM 792 as Macroporous Aggregates through Cryogelation for Butanol Production. *Process Biochem.* **2014**, *49* (1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.09.027>.
- (119) Berillo, D. A.; Caplin, J. L.; Cundy, A. B.; Savina, I. N. A Cryogel-Based Bioreactor for Water Treatment Applications. *Water Res.* **2019**, *153*, 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.028>.
- (120) Dedov, A. G.; Ivanova, E. A.; Sandzhieva, D. A.; Lobakova, E. S.; Kashcheeva, P. B.; Kirpichnikov, M. P.; Ishkov, A. G.; Buznik, V. M. New Materials and Ecology: Biocomposites for Aquatic Remediation. *Theor. Found. Chem. Eng.* **2017**, *51* (4), 617–630. <https://doi.org/10.1134/S0040579517040042>.
- (121) Choi, M.; Chaudhary, R.; Lee, M.; Kim, J.; Cho, K.; Chung, Y. C.; Bae, H.; Park, J. Enhanced Selective Enrichment of Partial Nitrification and Anammox Bacteria in a Novel Two-Stage Continuous Flow System Using Flat-Type Poly (Vinylalcohol) Cryogel Films. *Bioresour. Technol.* **2020**, *300* (December 2019), 122546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122546>.
- (122) Liu, S. H.; Zeng, Z. T.; Niu, Q. Y.; Xiao, R.; Zeng, G. M.; Liu, Y.; Cheng, M.; Hu, K.; Jiang, L. H.; Tan, X. F.; Tao, J. J. Influence of Immobilization on Phenanthrene Degradation by *Bacillus* Sp. P1 in the Presence of Cd(II). *Sci. Total Environ.* **2019**, *655*, 1279–1287. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.272>.
- (123) Schoebitz, M.; López, M. D.; Roldán, A. Bioencapsulation of Microbial Inoculants for Better Soil-Plant Fertilization. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2013**, *33* (4), 751–765. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>.
- (124) Alkayyali, T.; Cameron, T.; Haltli, B.; Kerr, R. G.; Ahmadi, A. Microfluidic and Cross-Linking Methods for Encapsulation of Living Cells and Bacteria - A Review. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1053*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.056>.
- (125) Fakhrullin, R. F.; Minullina, R. T. Hybrid Cellular-Inorganic Core-Shell Microparticles: Encapsulation of Individual Living Cells in Calcium Carbonate Microshells. *Langmuir* **2009**, *25* (12), 6617–6621. <https://doi.org/10.1021/la901395z>.
- (126) Liu, B.; Cao, Y.; Chen, D.; Kong, J.; Deng, J. Amperometric Biosensor Based on a Nanoporous ZrO<sub>2</sub> Matrix. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478* (1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01480-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01480-0).
- (127) Mark, H.; Richard, W. Components and Control of Silicification in Diatoms. **2003**, *33*, 11–57. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55486-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55486-5_2).
- (128) Livage, J.; Coradin, T.; Roux, C. Encapsulation of Biomolecules in Silica Gels. *J. Phys. Condens. Matter* **2001**, *13* (33). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/13/33/202>.
- (129) Wang, X.; Ahmed, N.; Alvarez, G.; Tuttolomondo, M.; Helary, C.; Desimone, M.; Coradin, T. Sol-Gel Encapsulation of Biomolecules and Cells for Medicinal Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15* (3), 223–244. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141229112734>.
- (130) Ferrer, M. L.; Yuste, L.; Rojo, F.; Del Monte, F. Biocompatible Sol-Gel Route for Encapsulation of Living Bacteria in Organically Modified Silica Matrixes. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (19), 3614–3618. <https://doi.org/10.1021/cm034372t>.
- (131) Shchipunov, Y. A.; Karpenko, T. Y.; Bakunina, I. Y.; Burtseva, Y. V.; Zvyagintseva, T. N. A New Precursor for the Immobilization of Enzymes inside Sol-Gel-Derived Hybrid Silica Nanocomposites Containing Polysaccharides. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *58* (1), 25–

38. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00108-8).
- (132) Coiffier, A.; Coradin, T.; Roux, C.; Bouvet, O. M. M.; Livage, J. Sol-Gel Encapsulation of Bacteria: A Comparison between Alkoxide and Aqueous Routes. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11* (8), 2039–2044. <https://doi.org/10.1039/b101308o>.
- (133) Darder, M.; Aranda, P.; Burgos-Asperilla, L.; Llobera, A.; Cadarso, V. J.; Fernández-Sánchez, C.; Ruiz-Hitzky, E. Algae-Silica Systems as Functional Hybrid Materials. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (42), 9362–9369. <https://doi.org/10.1039/b913269d>.
- (134) Shitanda, I.; Takamatsu, S.; Watanabe, K.; Itagaki, M. Amperometric Screen-Printed Algal Biosensor with Flow Injection Analysis System for Detection of Environmental Toxic Compounds. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (21), 4933–4936. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.04.005>.
- (135) Meunier, C. F.; Dandoy, P.; Su, B. L. Encapsulation of Cells within Silica Matrixes: Towards a New Advance in the Conception of Living Hybrid Materials. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *342* (2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.050>.
- (136) Stolarzewicz, I.; Bialecka-Florjańczyk, E.; Majewska, E.; Krzyczkowska, J. Immobilization of Yeast on Polymeric Supports. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *25* (1), 135–144.
- (137) ZHANG, L. sheng; WU, W. zhong; WANG, J. long. Immobilization of Activated Sludge Using Improved Polyvinyl Alcohol (PVA) Gel. *J. Environ. Sci.* **2007**, *19* (11), 1293–1297. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60211-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60211-3).
- (138) Draget, K. I. Alginates. *Handb. Hydrocoll. Second Ed.* **2009**, 807–828. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.807>.
- (139) Bernkop-Schnürch, A.; Kast, C. E.; Richter, M. F. Improvement in the Mucoadhesive Properties of Alginate by the Covalent Attachment of Cysteine. *J. Control. Release* **2001**, *71* (3), 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00227-9).
- (140) Stephen, A. M.; Phillips, G. O.; Williams, P. A. *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition*; 2016.
- (141) Silva, J. A. L. da & Rao, M. A. Food Polysaccharides and Their Applications. In (eds. Alistair, S. M., Glyn, P. O. & A.Peter, W.); 2016; pp 353–412 (CRC Press, 2006).
- (142) Willats, W. G. T.; Knox, J. P.; Mikkelsen, J. D. Pectin: New Insights into an Old Polymer Are Starting to Gel. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17* (3), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>.
- (143) García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez, E. Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18* (7), 549–579. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00050-1).
- (144) Nordin, N. Z.; Rashidi, A. R.; Dailin, D. J.; Malek, R. A.; Azelee, N. I. W.; Nor, Hasmaliana Abd Manas Shanmugaparakasham, S.; Zaidel, Dayang Norulfairuz Abg, A.; Abd, R. A.; Sukmawati, D.; Enshasy, H. El. Xanthan Biopolymer in Pharmaceutical and Cosmeceutical Applications: Critical Review. *Biosci. Res.* **2020**, *volume 17* (February), 205–220.
- (145) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- (146) Kurita, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8* (3), 203–226. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>.
- (147) Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H. P.; Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.
- (148) Coffey, D. G., Bell, D. A. & Henderson, A. Food Polysaccharides and Their Applications. In (eds. Alistair, S. M., Glyn, P. O. & A.Peter, W.); 2006; pp 147–180.

- (149) Copeland, L.; Blazek, J.; Salman, H.; Tang, M. C. Form and Functionality of Starch. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (6), 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>.
- (150) Zobel, H. F.; Stephen, A. M. Food Polysaccharides and Their Applications. In *eds. Alistair, S. M., Glyn, P. O. & A.Peter, W.*; 2006; pp 25–86.
- (151) Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y. Biomedical Applications of Collagen. *Int. J. Pharm.* **2001**, *221* (1–2), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3).
- (152) Prang, P.; Müller, R.; Eljaouhari, A.; Heckmann, K.; Kunz, W.; Weber, T.; Faber, C.; Vroemen, M.; Bogdahn, U.; Weidner, N. The Promotion of Oriented Axonal Regrowth in the Injured Spinal Cord by Alginate-Based Anisotropic Capillary Hydrogels. *Biomaterials* **2006**, *27* (19), 3560–3569. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.053>.
- (153) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>.
- (154) Balakrishnan, B.; Jayakrishnan, A. Self-Cross-Linking Biopolymers as Injectable in Situ Forming Biodegradable Scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3941–3951. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.005>.
- (155) Qin, K.; Pereira, R. F. P.; Coradin, T.; de Zea Bermudez, V.; Fernandes, F. M. Redesigned Silk: A New Macroporous Biomaterial Platform for Antimicrobial Dermal Patches with Unique Exudate Wicking Ability. *ChemRxiv* **2020**. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.13216196.v1>.
- (156) Frédéric Byette. Matériaux à Base de Protéines Avec Applications Biomédicales : La Fibroïne de Soie Comme Support Pour Cultures Cellulaires. **2010**, 107.
- (157) Shukla, R.; Cheryan, M. Zein: The Industrial Protein from Corn. *Ind. Crops Prod.* **2001**, *13* (3), 171–192. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9).
- (158) Feldman, D.; Lacasse, M.; Beznaczuk, L. M. Lignin-Polymer Systems and Some Applications. *Prog. Polym. Sci.* **1986**, *12* (4), 271–299. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(86\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0079-6700(86)90002-X).
- (159) *Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber*; 2014.
- (160) Christoph, S.; Hamraoui, A.; Bonnin, E.; Garnier, C.; Coradin, T.; Fernandes, F. M. Ice-Templating Beet-Root Pectin Foams: Controlling Texture, Mechanics and Capillary Properties. *Chem. Eng. J.* **2018**, *350* (May), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.160>.
- (161) Wang, Y. J. Development of New Polycations for Cell Encapsulation with Alginate. *Mater. Sci. Eng. C* **2000**, *13* (1–2), 59–63. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(00\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(00)00177-6).
- (162) De Vos, P.; Lazarjani, H. A.; Poncelet, D.; Faas, M. M. Polymers in Cell Encapsulation from an Enveloped Cell Perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.005>.
- (163) JARVIS, M. C. Structure and Properties of Pectin Gels in Plant Cell Walls. *Plant. Cell Environ.* **1984**, *7* (3), 153–164. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11614586>.
- (164) Nwodo, U. U.; Green, E.; Okoh, A. I. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (11), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>.
- (165) Mazzitelli, S.; Capretto, L.; Quinci, F.; Piva, R.; Nastruzzi, C. Preparation of Cell-Encapsulation Devices in Confined Microenvironment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (11–12), 1533–1555. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.021>.
- (166) Melvik, J. E.; Dornish, M. Alginate as a Carrier for Cell Immobilisation. *Kluwer Acad. Publ.* **2004**, 33–51. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3_2).
- (167) Dong, Y.; Zhang, Y.; Tu, B.; Miao, J. Immobilization of Ammonia-Oxidizing Bacteria by Calcium Alginate. *Ecol. Eng.* **2014**, *73*, 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.020>.
- (168) Dursun, A. Y.; Aksu, Z. Biodegradation Kinetics of Ferrous(II) Cyanide Complex Ions by



- Immobilized *Pseudomonas Fluorescens* in a Packed Bed Column Reactor. *Process Biochem.* **2000**, *35* (6), 615–622. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00110-7).
- (169) Chung, T. P.; Tseng, H. Y.; Juang, R. S. Mass Transfer Effect and Intermediate Detection for Phenol Degradation in Immobilized *Pseudomonas Putida* Systems. *Process Biochem.* **2003**, *38* (10), 1497–1507. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00038-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00038-4).
- (170) Stone, S. A.; Gosavi, P.; Athauda, T. J.; Ozer, R. R. In Situ Citric Acid Crosslinking of Alginate/Polyvinyl Alcohol Electrospun Nanofibers. *Mater. Lett.* **2013**, *112*, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.100>.
- (171) Chapatwala, K. D.; Babu, G. R. V.; Vijaya, O. K.; Kumar, K. P.; Wolfram, J. H. Biodegradation of Cyanides, Cyanates and Thiocyanates to Ammonia and Carbon Dioxide by Immobilized Cells of *Pseudomonas Putida*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *20* (1), 28–33. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900469>.
- (172) Aimé, C.; Coradin, T. Nanocomposites from Biopolymer Hydrogels: Blueprints for White Biotechnology and Green Materials Chemistry. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2012**, *50* (10), 669–680. <https://doi.org/10.1002/polb.23061>.
- (173) Wang, D.; Romer, F.; Connell, L.; Walter, C.; Saiz, E.; Yue, S.; Lee, P. D.; McPhail, D. S.; Hanna, J. V.; Jones, J. R. Highly Flexible Silica/Chitosan Hybrid Scaffolds with Oriented Pores for Tissue Regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (38), 7560–7576. <https://doi.org/10.1039/c5tb00767d>.
- (174) Coradin, T.; Livage, J. Synthesis and Characterization of Alginate / Silica Biocomposites. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **2003**, *26*, 1165–1168.
- (175) Perullini, M.; Amoura, M.; Jobbágy, M.; Roux, C.; Livage, J.; Coradin, T.; Bilmes, S. A. Improving Bacteria Viability in Metal Oxide Hosts via an Alginate-Based Hybrid Approach. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (22), 8026–8031. <https://doi.org/10.1039/c1jm10684h>.
- (176) Desmet, J.; Meunier, C.; Danloy, E.; Duprez, M. E.; Lox, F.; Thomas, D.; Hantson, A. L.; Crine, M.; Toye, D.; Rooke, J.; Su, B. L. Highly Efficient, Long Life, Reusable and Robust Photosynthetic Hybrid Core-Shell Beads for the Sustainable Production of High Value Compounds. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *448*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.091>.
- (177) Sakai, S.; Ono, T.; Ijima, H.; Kawakami, K. In Vitro and in Vivo Evaluation of Alginate/Sol-Gel Synthesized Aminopropyl-Silicate/Alginate Membrane for Bioartificial Pancreas. *Biomaterials* **2002**, *23* (21), 4177–4183. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00159-X).
- (178) Ramachandran, S.; Coradin, T.; Jain, P. K.; Verma, S. K. Nostoc Caldicola Immobilized in Silica-Coated Calcium Alginate and Silica Gel for Applications in Heavy Metal Biosorption. *Silicon* **2009**, *1* (4), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s12633-009-9032-0>.
- (179) Deville, S. Ice-Templating, Freeze Casting: Beyond Materials Processing. *J. Mater. Res.* **2013**, *28* (17), 2202–2219. <https://doi.org/10.1557/jmr.2013.105>.
- (180) Asuncion, M. C. T.; Goh, J. C. H.; Toh, S. L. Anisotropic Silk Fibroin/Gelatin Scaffolds from Unidirectional Freezing. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.087>.
- (181) Munch, E.; Launey, M. E.; Alsem, D. H.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O. Tough, Bio-Inspired Hybrid Materials. *Science* (80-. ). **2008**, *322* (5907), 1516–1520. <https://doi.org/10.1126/science.1164865>.
- (182) Bai, H.; Polini, A.; Delattre, B.; Tomsia, A. P. Thermoresponsive Composite Hydrogels with Aligned Macroporous Structure by Ice-Templated Assembly. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (22), 4551–4556. <https://doi.org/10.1021/cm4025827>.
- (183) Shao, Y.; El-Kady, M. F.; Lin, C. W.; Zhu, G.; Marsh, K. L.; Hwang, J. Y.; Zhang, Q.; Li, Y.; Wang, H.; Kaner, R. B. 3D Freeze-Casting of Cellular Graphene Films for Ultrahigh-Power-Density Supercapacitors. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (31), 6719–6726.

<https://doi.org/10.1002/adma.201506157>.

- (184) Wicklein, B.; Kocjan, A.; Salazar-Alvarez, G.; Carosio, F.; Camino, G.; Antonietti, M.; Bergström, L. Thermally Insulating and Fire-Retardant Lightweight Anisotropic Foams Based on Nanocellulose and Graphene Oxide. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10* (3), 277–283. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.248>.
- (185) Naviroj, M.; Wang, M. M.; Johnson, M. T.; Faber, K. T. Nucleation-Controlled Freeze Casting of Pre ceramic Polymers for Uniaxial Pores in Si-Based Ceramics. *Scr. Mater.* **2017**, *130*, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2016.10.038>.
- (186) Zhao, N.; Li, M.; Gong, H.; Bai, H. Controlling Ice Formation on Gradient Wettability Surface for High-Performance Bioinspired Materials. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (31), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb4712>.
- (187) Nelson, I.; Naleway, S. E. Intrinsic and Extrinsic Control of Freeze Casting. *J. Mater. Res. Technol.* **2019**, *8* (2), 2372–2385. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.11.011>.
- (188) Deville, S.; Saiz, E.; Tomsia, A. P. Ice-Templated Porous Alumina Structures. *Acta Mater.* **2007**, *55* (6), 1965–1974. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2006.11.003>.
- (189) Qin, K.; Parisi, C.; Fernandes, F. M. Recent Advances in Ice Templating: From Biomimetic Composites to Cell Culture Scaffolds and Tissue Engineering. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9* (4), 889–907. <https://doi.org/10.1039/d0tb02506b>.
- (190) Shao, G.; Hanaor, D. A. H.; Shen, X.; Gurlo, A. Freeze Casting: From Low-Dimensional Building Blocks to Aligned Porous Structures—A Review of Novel Materials, Methods, and Applications. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (17). <https://doi.org/10.1002/adma.201907176>.
- (191) Liu, R.; Xu, T.; Wang, C. an. A Review of Fabrication Strategies and Applications of Porous Ceramics Prepared by Freeze-Casting Method. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 2907–2925. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.148>.
- (192) Deville, S. Understanding the Freezing of Colloidal Suspensions: Crystal Growth and Particle Redistribution. In *Ice-templating: processing routes, architectures, and microstructures*; Springer International Publishing, 2017; pp 91–170. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50515-2\\_391](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50515-2_391).
- (193) Deville, S. *Ice-Templating: Processing Routes, Architectures, and Microstructures*; 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50515-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50515-2_4).
- (194) Deville, S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. *Adv. Eng. Mater.* **2008**, *10* (3), 155–169. <https://doi.org/10.1002/adem.200700270>.
- (195) Bai, Y.; Liu, R.; Wang, Y.; Xiao, H.; Liu, Y.; Yuan, G. High Ion Transport within a Freeze-Casted Gel Film for High-Rate Integrated Flexible Supercapacitors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (46), 43294–43302. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b16708>.
- (196) Wang, Q.; Wang, X.; Wan, F.; Chen, K.; Niu, Z.; Chen, J. An All-Freeze-Casting Strategy to Design Typographical Supercapacitors with Integrated Architectures. *Small* **2018**, *14* (23), 1–9. <https://doi.org/10.1002/sml.201800280>.
- (197) Xie, M.; Zhang, Y.; Kraśny, M. J.; Bowen, C.; Khanbareh, H.; Gathercole, N. Flexible and Active Self-Powered Pressure, Shear Sensors Based on Freeze Casting Ceramic-Polymer Composites. *Energy Environ. Sci.* **2018**, *11* (10), 2919–2927. <https://doi.org/10.1039/c8ee01551a>.
- (198) Zhang, Y.; Roscow, J.; Xie, M.; Bowen, C. High Piezoelectric Sensitivity and Hydrostatic Figures of Merit in Unidirectional Porous Ferroelectric Ceramics Fabricated by Freeze Casting. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2018**, *38* (12), 4203–4211. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.04.067>.
- (199) Rieu, C.; Parisi, C.; Mosser, G.; Haye, B.; Coradin, T.; Fernandes, F. M.; Trichet, L. Topotactic

- Fibrillogenesis of Freeze-Cast Microridged Collagen Scaffolds for 3D Cell Culture. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (16), 14672–14683. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b03219>.
- (200) Nyström, G.; Fong, W. K.; Mezzenga, R. Ice-Templated and Cross-Linked Amyloid Fibril Aerogel Scaffolds for Cell Growth. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (9), 2858–2865. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00792>.
- (201) Guex, A. G.; Puetzer, J. L.; Armgarth, A.; Littmann, E.; Stavrinidou, E.; Giannelis, E. P.; Malliaras, G. G.; Stevens, M. M. Highly Porous Scaffolds of PEDOT:PSS for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2017**, *62*, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.045>.
- (202) Ojuva, A.; Akhtar, F.; Tomsia, A. P.; Bergström, L. Laminated Adsorbents with Very Rapid CO<sub>2</sub> Uptake by Freeze-Casting of Zeolites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (7), 2669–2676. <https://doi.org/10.1021/am400122r>.
- (203) Gutiérrez, M. C.; García-Carvajal, Z. Y.; Jobbágy, M.; Yuste, L.; Rojo, F.; Abrusci, C.; Catalina, F.; Del Monte, F.; Ferrer, M. L. Hydrogel Scaffolds with Immobilized Bacteria for 3D Cultures. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (8), 1968–1973. <https://doi.org/10.1021/cm062882s>.
- (204) Schoof, H.; Bruns, L.; Fischer, A.; Heschel, I.; Rau, G. Dendritic Ice Morphology in Unidirectionally Solidified Collagen Suspensions. *J. Cryst. Growth* **2000**, *209* (1), 122–129. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00519-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00519-9).
- (205) Madihally, S. V.; Matthew, H. W. T. Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials* **1999**, *20* (12), 1133–1142. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00011-3).
- (206) Liu, Y.; Zhu, W.; Guan, K.; Peng, C.; Wu, J. Freeze-Casting of Alumina Ultra-Filtration Membranes with Good Performance for Anionic Dye Separation. *Ceram. Int.* **2018**, *44* (10), 11901–11904. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.03.160>.
- (207) Moon, J. W.; Hwang, H. J.; Awano, M.; Maeda, K. Preparation of NiO-YSZ Tubular Support with Radially Aligned Pore Channels. *Mater. Lett.* **2003**, *57* (8), 1428–1434. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)01002-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(02)01002-9).
- (208) Çadirli, E.; Marasli, N.; Bayender, B.; Gündüz, M. Dependency of the Microstructure Parameters on the Solidification Parameters for Camphene. *Mater. Res. Bull.* **2000**, *35* (6), 985–995. [https://doi.org/10.1016/S0025-5408\(00\)00285-3](https://doi.org/10.1016/S0025-5408(00)00285-3).
- (209) Yang, H.; Ye, F.; Liu, Q.; Liu, S.; Gao, Y.; Liu, L. A Novel Silica Aerogel/Porous Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Composite Prepared by Freeze Casting and Sol-Gel Impregnation with High-Performance Thermal Insulation and Wave-Transparent. *Mater. Lett.* **2015**, *138*, 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.012>.
- (210) Li, D.; Li, M. Porous Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub> Ceramic with Low Thermal Conductivity. *J. Mater. Sci. Technol.* **2012**, *28* (9), 799–802. [https://doi.org/10.1016/S1005-0302\(12\)60133-9](https://doi.org/10.1016/S1005-0302(12)60133-9).
- (211) Launey, M. E.; Munch, E.; Alsem, D. H.; Barth, H. B.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O. Designing Highly Toughened Hybrid Composites through Nature-Inspired Hierarchical Complexity. *Acta Mater.* **2009**, *57* (10), 2919–2932. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2009.03.003>.
- (212) Garnier, M. J.; Dunand, D. C. Ni-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nacre-like Composites through Hot-Pressing of Freeze-Cast Foams. *Mater. Sci. Eng. A* **2019**, *743* (September 2018), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2018.11.033>.
- (213) Deville, S.; Saiz, E.; Tomsia, A. P. Freeze Casting of Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2006**, *27* (32), 5480–5489. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.028>.
- (214) Wat, A.; Lee, J. I.; Ryu, C. W.; Gludovatz, B.; Kim, J.; Tomsia, A. P.; Ishikawa, T.; Schmitz, J.; Meyer, A.; Alfreider, M.; Kiener, D.; Park, E. S.; Ritchie, R. O. Bioinspired Nacre-like Alumina with a Bulk-Metallic Glass-Forming Alloy as a Compliant Phase. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08753-6>.

- (215) Mallick, K. K. Freeze Casting of Porous Bioactive Glass and Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **2009**, 92 (SUPPL. 1), 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02784.x>.
- (216) Jung, J. Y.; Naleway, S. E.; Maker, Y. N.; Kang, K. Y.; Lee, J.; Ha, J.; Hur, S. S.; Chien, S.; McKittrick, J. 3D Printed Templating of Extrinsic Freeze-Casting for Macro-Microporous Biomaterials. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, 5 (5), 2122–2133. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01308>.
- (217) Mao, L. B.; Gao, H. L.; Yao, H. Bin; Liu, L.; Cölfen, H.; Liu, G.; Chen, S. M.; Li, S. K.; Yan, Y. X.; Liu, Y. Y.; Yu, S. H. Synthetic Nacre by Predesigned Matrix-Directed Mineralization. *Science (80-. )*. **2016**, 354 (6308), 107–110. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8991>.
- (218) Xu, W.; Xing, Y.; Liu, J.; Wu, H.; Cui, Y.; Li, D.; Guo, D.; Li, C.; Liu, A.; Bai, H. Efficient Water Transport and Solar Steam Generation via Radially, Hierarchically Structured Aerogels. *ACS Nano* **2019**, 13 (7), 7930–7938. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b02331>.
- (219) Yu, Z. L.; Yang, N.; Zhou, L. C.; Ma, Z. Y.; Zhu, Y. B.; Lu, Y. Y.; Qin, B.; Xing, W. Y.; Ma, T.; Li, S. C.; Gao, H. L.; Wu, H. A.; Yu, S. H. Bioinspired Polymeric Woods. *Sci. Adv.* **2018**, 4 (8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7223>.
- (220) Francis, N. L.; Hunger, P. M.; Donius, A. E.; Riblett, B. W.; Zavaliangos, A.; Wegst, U. G. K.; Wheatley, M. A. An Ice-Templated, Linearly Aligned Chitosan-Alginate Scaffold for Neural Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2013**, 101 (12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34668>.
- (221) Pawelec, K. M.; Husmann, A.; Best, S. M.; Cameron, R. E. Ice-Templated Structures for Biomedical Tissue Repair: From Physics to Final Scaffolds. *Appl. Phys. Rev.* **2014**, 1 (2). <https://doi.org/10.1063/1.4871083>.
- (222) Jaafar, Z.; Queleñec, B.; Moreau, C.; Lourdin, D.; Maigret, J. E.; Pontoire, B.; D'orlando, A.; Coradin, T.; Duchemin, B.; Fernandes, F. M.; Cathala, B. Plant Cell Wall Inspired Xyloglucan/Cellulose Nanocrystals Aerogels Produced by Freeze-Casting. *Carbohydr. Polym.* **2020**, 247 (June), 116642. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116642>.
- (223) Zhang, X.; Liu, M.; Wang, H.; Yan, N.; Cai, Z.; Yu, Y. Ultralight, Hydrophobic, Anisotropic Bamboo-Derived Cellulose Nanofibrils Aerogels with Excellent Shape Recovery via Freeze-Casting. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 208 (8), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.073>.
- (224) Chau, M.; De France, K. J.; Kopera, B.; Machado, V. R.; Rosenfeldt, S.; Reyes, L.; Chan, K. J. W.; Förster, S.; Cranston, E. D.; Hoare, T.; Kumacheva, E. Composite Hydrogels with Tunable Anisotropic Morphologies and Mechanical Properties. *Chem. Mater.* **2016**, 28 (10), 3406–3415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b00792>.
- (225) Gorgieva, S.; Vogrinčič, R.; Kokol, V. The Effect of Membrane Structure Prepared from Carboxymethyl Cellulose and Cellulose Nanofibrils for Cationic Dye Removal. *J. Polym. Environ.* **2019**, 27 (2), 318–332. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1341-1>.
- (226) Yin, K.; Divakar, P.; Wegst, U. G. K. Plant-Derived Nanocellulose as Structural and Mechanical Reinforcement of Freeze-Cast Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (10), 3733–3745. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00784>.
- (227) Yin, K.; Divakar, P.; Wegst, U. G. K. Freeze-Casting Porous Chitosan Ureteral Stents for Improved Drainage. *Acta Biomater.* **2019**, 84, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.005>.
- (228) Zmora, S.; Glicklis, R.; Cohen, S. Tailoring the Pore Architecture in 3-D Alginate Scaffolds by Controlling the Freezing Regime during Fabrication. - 2002 - Zmora, Glicklis, Cohen.Pdf. **2002**, 23, 4087–4094.
- (229) Schoof, H.; Apel, J.; Heschel, I.; Rau, G. Control of Pore Structure and Size in Freeze-Dried Collagen Sponges. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 58 (4), 352–357.

<https://doi.org/10.1002/jbm.1028>.

- (230) Christine, M.; Asuncion, T.; Goh, J. C.; Toh, S. Anisotropic Silk Fibroin / Gelatin Scaffolds from Unidirectional Freezing. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *67*, 646–656. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.087>.
- (231) Wegst, U. G. K.; Schecter, M.; Donius, A. E.; Hunger, P. M. Biomaterials by Freeze Casting. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368* (1917), 2099–2121. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0014>.
- (232) Thibert, E.; Dominé, F. Thermodynamics and Kinetics of the Solid Solution of HCl in Ice. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3554–3565. <https://doi.org/10.1021/jp962115o>.
- (233) Thibert, E.; Dominé, F. Thermodynamics and Kinetics of the Solid Solution of HNO<sub>3</sub> in Ice. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (22), 4432–4439. <https://doi.org/10.1021/jp980569a>.
- (234) Bronstein, V. L.; Itkin, Y. A.; Ishkov, G. S. Rejection and Capture of Cells by Ice Crystals on Freezing Aqueous Solutions. *J. Cryst. Growth* **1981**, *52* (PART 1), 345–349. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(81\)90216-5](https://doi.org/10.1016/0022-0248(81)90216-5).
- (235) Körber, C. Phenomena at the Advancing Ice—Liquid Interface: Solutes Particles and Biological Cells. *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21* (2), 229–298. <https://doi.org/10.1017/S0033583500004303>.
- (236) Deville, S.; Maire, E.; Bernard-Granger, G.; Lasalle, A.; Bogner, A.; Gauthier, C.; Leloup, J.; Guizard, C. Metastable and Unstable Cellular Solidification of Colloidal Suspensions. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (12), 966–972. <https://doi.org/10.1038/nmat2571>.
- (237) Cryobiology: The Freezing of Biological Systems Author (s): Peter Mazur Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.com/stable/1729310>. **1970**, *168* (3934), 939–949.
- (238) Mazur, P.; Leibo, S. P.; Chu, E. H. Y. A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury. Evidence from Chinese Hamster Tissue-Culture Cells. *Exp. Cell Res.* **1972**, *71* (2), 345–355. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5).
- (239) Polge, C.; Smith, A. U.; Parkes, A. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration. *Nature (London)*. 1949, p 666.
- (240) Lovelock, J. E.; Bishop, M. H. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature* **1959**, *183*, 1394–1395.
- (241) Miyamoto, H.; Ishibashi, T. The Protective Action of Glycols against Freezing Damage of Mouse and Rat Embryos. *J. Reprod. Fertil.* **1978**, *54* (2), 427–432. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540427>.
- (242) Utsumi, K.; Fujii, Y.; Nishimura, K.; Yuhata, K. Simple Freezing Method of Rabbit Embryos by Liquid Nitrogen Gas. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **1979**, *25*, 53–54.
- (243) Meryman, H. T. Cryopreservation of Living Cells: Principles and Practice. *Transfusion* **2007**, *47* (5), 935–945. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x>.
- (244) Oldenhof, W. F. W. and H. *Cryopreservation and Freeze-Drying*; 2021; Vol. 1257.
- (245) MAZUR, P. Kinetics of Water Loss From Cells At Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J. Gen. Physiol.* **1963**, *47*, 347–369. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>.
- (246) Woelders, H.; Chaveiro, A. Theoretical Prediction of “optimal” Freezing Programmes. *Cryobiology* **2004**, *49* (3), 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.09.001>.
- (247) Balint, B.; Paunovic, D.; Vucetic, D.; Vojvodic, D.; Petakov, M.; Trkuljic, M.; Stojanovic, N. Controlled-Rate versus Uncontrolled-Rate Freezing as Predictors for Platelet Cryopreservation Efficacy. *Transfusion* **2006**, *46* (2), 230–235. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00706.x>.
- (248) Fahy, G. M.; MacFarlane, D. R.; Angell, C. A.; Meryman, H. T. Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology* **1984**, *21* (4), 407–426. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90079-8).

- (249) Fahy, G. M.; Hirsh, A. Prospects for Organ Preservation by Vitrification. In *Organ Preservation*; Springer, Dordrecht, 1982; pp 339–404. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-011-6267-8\\_60](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-011-6267-8_60).
- (250) Takahashi, T.; Hirsh, A.; Erbe, E.; Williams, R. J. Mechanism of Cryoprotection by Extracellular Polymeric Solutes. *Biophys. J.* **1988**, *54* (3), 509–518. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(88\)82983-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(88)82983-7).
- (251) Park, M. S.; Golovin, A. A.; Davis, S. H. The Encapsulation of Particles and Bubbles by an Advancing Solidification Front. *J. Fluid Mech.* **2006**, *560* (June), 415–436. <https://doi.org/10.1017/S0022112006000796>.
- (252) Pannier, A.; Mkandawire, M.; Soltmann, U.; Pompe, W.; Böttcher, H. Biological Activity and Mechanical Stability of Sol-Gel-Based Biofilters Using the Freeze-Gelation Technique for Immobilization of *Rhodococcus Ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93* (4), 1755–1767. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3489-7>.
- (253) Gutiérrez, M. C.; García-Carvajal, Z. Y.; Hortigüela, M. J.; Yuste, L.; Rojo, F.; Ferrer, M. L.; Del Monte, F. Biocompatible MWCNT Scaffolds for Immobilization and Proliferation of *E. Coli*. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17* (29), 2992–2995. <https://doi.org/10.1039/b707504a>.
- (254) Baccile, N.; Zinn, T.; Laurent, G. P.; Messaoud, G. Ben; Cristiglio, V.; Fernandes, F. M. Unveiling the Interstitial Pressure between Growing Ice Crystals during Ice-Templating Using a Lipid Lamellar Probe. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11* (6), 1989–1997. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b03347>.
- (255) Ishiguro, H.; Rubinsky, B. Mechanical Interaction between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification \_ 1994. *Cryobiology* **1994**, *31*, 483–500.
- (256) Wittmann, C.; Poblete-Castro, I.; Borrero-de Acuna, J. M.; Nickel, P. I.; Kohlstedt, M. Host Organism: *Pseudomonas Putida*. *Ind. Biotechnol.* **2017**, 299–326. <https://doi.org/10.1002/9783527807796.ch8>.
- (257) Timmis, K. N. *Pseudomonas Putida*: A Cosmopolitan. *Environ. Microbiol.* **2002**, *4* (12), 779–781.
- (258) Roma-Rodrigues, C.; Santos, P. M.; Benndorf, D.; Rapp, E.; Sá-Correia, I. Response of *Pseudomonas Putida* KT2440 to Phenol at the Level of Membrane Proteome. *J. Proteomics* **2010**, *73* (8), 1461–1478. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.02.003>.
- (259) Domínguez-Cuevas, P.; González-Pastor, J. E.; Marqués, S.; Ramos, J. L.; De Lorenzo, V. Transcriptional Tradeoff between Metabolic and Stress-Response Programs in *Pseudomonas Putida* KT2440 Cells Exposed to Toluene. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (17), 11981–11991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509848200>.
- (260) Harayama, S.; Rekik, M. Comparison of the Nucleotide Sequences of the Meta-Cleavage Pathway Genes of TOL Plasmid PWW0 from *Pseudomonas Putida* with Other Meta-Cleavage Genes Suggests That Both Single and Multiple Nucleotide Substitutions Contribute to Enzyme Evolution. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1993**, *239* (1–2), 81–89. <https://doi.org/10.1007/BF00281605>.
- (261) Nakazawa, T. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the World. *Environ. Microbiol.* **2002**, *4* (12), 782–786. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x>.
- (262) Mansour, H. Ben; Mosrati, R.; Corroler, D.; Ghedira, K.; Barillier, D.; Chekir-Ghedira, L. Mutagenicity and Genotoxicity of Acid Yellow 17 and Its Biodegradation Products. *Drug Chem. Toxicol.* **2009**, *32* (3), 222–229. <https://doi.org/10.1080/01480540902862269>.
- (263) Mansour, H. Ben; Corroler, D.; Barillier, D.; Ghedira, K.; Chekir, L.; Mosrati, R. Evaluation of Genotoxicity and Pro-Oxidant Effect of the Azo Dyes: Acids Yellow 17, Violet 7 and Orange 52, and of Their Degradation Products by *Pseudomonas Putida* Mt-2. **2007**, *45*, 1670–1677. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.033>.

- (264) Thao, T. P.; Kao, H. C.; Juang, R. S.; Lan, J. C. W. Kinetic Characteristics of Biodegradation of Methyl Orange by *Pseudomonas Putida* Mt2 in Suspended and Immobilized Cell Systems. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2013**, *44* (5), 780–785. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.01.015>.
- (265) Duetz, W. A.; Wind, B.; Van Andel, J. G.; Barnes, M. R.; Williams, P. A.; Rutgers, M. Biodegradation Kinetics of Toluene, m-Xylene, p-Xylene and Their Intermediates through the Upper TOL Pathway in *Pseudomonas Putida* (PWWO). *Microbiology* **1998**, *144* (6), 1669–1675. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-6-1669>.
- (266) Flemming, H. C.; Neu, T. R.; Wozniak, D. J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (22), 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>.
- (267) Read, R. R.; Costerton, J. W. Purification and Characterization of Adhesive Exopolysaccharides from *Pseudomonas Putida* and *Pseudomonas Fluorescenc.* *Can. J. Microbiol.* **1987**, *33* (12), 1080–1090. <https://doi.org/10.1139/m87-189>.
- (268) Svenningsen, N. B.; Martínez-García, E.; Nicolaisen, M. H.; de Lorenzo, V.; Nybroe, O. The Biofilm Matrix Polysaccharides Cellulose and Alginate Both Protect *Pseudomonas Putida* Mt-2 against Reactive Oxygen Species Generated under Matric Stress and Copper Exposure. *Microbiol. (United Kingdom)* **2018**, *164* (6), 883–888. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000667>.
- (269) Chang, W. S.; Van De Mortel, M.; Nielsen, L.; De Guzman, G. N.; Li, X.; Halverson, L. J. Alginate Production by *Pseudomonas Putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (22), 8290–8299. <https://doi.org/10.1128/JB.00727-07>.
- (270) ANDRESEN, I.-L.; SKIPNES, O.; SMIDSRØD, O.; OSTGAARD, K.; HEMMER, P. C. Some Biological Functions of Matrix Components in Benthic Algae in Relation to Their Chemistry and the Composition of Seawater. *Cellul. chemistry Technol.* **1977**, *48* (6), 361–381. <https://doi.org/10.1021/bk-1977-0048.ch024>.
- (271) Wang, X.; Spencer, H. G. Calcium Alginate Gels : Formation and Stability in the Presence of an Inert Electrolyte. *Polymer (Guildf).* **1998**, *39* (13), 2759–2764. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00597-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00597-1).
- (272) Fang, Y.; Al-Assaf, S.; Phillips, G. O.; Nishinari, K. Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate - The Journal of Physical Chemistry B (ACS Publications). ... *Phys. Chem. B* **2007**, 2456–2462.
- (273) Shahidi, F.; Han, X. Q. Encapsulation of Food Ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33* (6), 501–547. <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>.
- (274) Assadpour, E.; Jafari, S. M. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2019**, *10*, 103–131. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121641>.
- (275) Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications. *Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 1806–1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.
- (276) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- (277) Kikuchi, A.; Kawabuchi, M.; Sugihara, M.; Sakurai, Y.; Okano, T. Pulsed Dextran Release from Calcium-Alginate Gel Beads. *J. Control. Release* **1997**, *47* (1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01612-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01612-4).
- (278) Konsoula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M. Starch Hydrolysis by the Action of an Entrapped in Alginate Capsules  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus Subtilis*. *Process Biochem.* **2006**, *41* (2), 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.028>.
- (279) Leick, S.; Henning, S.; Degen, P.; Suter, D.; Rehage, H. Deformation of Liquid-Filled Calcium Alginate Capsules in a Spinning Drop Apparatus. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (12), 2950–

2958. <https://doi.org/10.1039/b921116k>.
- (280) Kang, E.; Choi, Y. Y.; Chae, S. K.; Moon, J. H.; Chang, J. Y.; Lee, S. H. Microfluidic Spinning of Flat Alginate Fibers with Grooves for Cell-Aligning Scaffolds. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (31), 4271–4277. <https://doi.org/10.1002/adma.201201232>.
- (281) Fan, Y.; Xu, Y.; Wang, D.; Zhang, L.; Sun, J.; Sun, L.; Zhang, B. Effect of Alginate Coating Combined with Yeast Antagonist on Strawberry (*Fragaria* × *Ananassa*) Preservation Quality. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *53* (1–2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.03.002>.
- (282) Rhim, J. W. Physical and Mechanical Properties of Water Resistant Sodium Alginate Films. *LWT - Food Sci. Technol.* **2004**, *37* (3), 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.008>.
- (283) Deville, S.; Saiz, E.; Nalla, R. K.; Tomsia, A. P. Freezing as a Path to Build Complex Composites. *Science* (80-. ). **2006**, *311* (5760), 515–518. <https://doi.org/10.1126/science.1120937>.
- (284) Yoon, B. H.; Koh, Y. H.; Park, C. S.; Kim, H. E. Generation of Large Pore Channels for Bone Tissue Engineering Using Camphene-Based Freeze Casting. *J. Am. Ceram. Soc.* **2007**, *90* (6), 1744–1752. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2007.01670.x>.
- (285) Nishihara, H.; Mukai, S. R.; Yamashita, D.; Tamon, H. Ordered Macroporous Silica by Ice Templating. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (3), 683–689. <https://doi.org/10.1021/cm048725f>.
- (286) Arav, A.; Natan, D. Directional Freezing of Reproductive Cells and Organs. *Reprod. Domest. Anim.* **2012**, *47* (SUPPL.4), 193–196. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02075.x>.
- (287) Bahari, L.; Bein, A.; Yashunsky, V.; Sirotinskaya, V.; Braslavsky, I. Cryopreservation of Adherent Mammalian Cells on Substrate by Slow Freezing. *Cryobiology* **2018**, *80*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.026>.
- (288) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- (289) Stolze, C.; Janoschka, T.; Schubert, U. S.; Müller, F. A.; Flauder, S. Directional Solidification with Constant Ice Front Velocity in the Ice-Templating Process. *Adv. Eng. Mater.* **2016**, *18* (1), 111–120. <https://doi.org/10.1002/adem.201500235>.
- (290) Kocherbitov, V. The Nature of Nonfreezing Water in Carbohydrate Polymers. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *150*, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.119>.
- (291) Wilson, P. *Supercooling*, InTech Ope.; 2012.
- (292) Morales-Hernández, J. A.; Singh, A. K.; Villanueva-Rodriguez, S. J.; Castro-Camus, E. Hydration Shells of Carbohydrate Polymers Studied by Calorimetry and Terahertz Spectroscopy. *Food Chem.* **2019**, *291*, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.132>.
- (293) Moynihan, C. T.; Eastal, A. J.; Wilder, J.; Tucker, J. Dependence of the Glass Transition Temperature on Heating and Cooling Rate. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78* (26), 2673–2677. <https://doi.org/10.1021/j100619a008>.
- (294) Buchholz, J.; Paul, W.; Varnik, F.; Binder, K. Cooling Rate Dependence of the Glass Transition Temperature of Polymer Melts: Molecular Dynamics Study. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117* (15), 7364–7372. <https://doi.org/10.1063/1.1508366>.
- (295) Qin, K.; Eschenbrenner, C.; Ginot, F.; Dedovets, D.; Coradin, T.; Deville, S.; Fernandes, F. M. Unveiling Cells' Local Environment during Cryopreservation by Correlative in Situ Spatial and Thermal Analyses. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11* (18), 7730–7738. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c01729>.
- (296) Waschki, T.; Oberacker, R.; Hoffmann, M. J. Control of Lamellae Spacing during Freeze



- Casting of Ceramics Using Double-Side Cooling as a Novel Processing Route. *J. Am. Ceram. Soc.* **2009**, 92 (SUPPL. 1), 79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02673.x>.
- (297) Fukasawa, T.; Ando, M.; Ohji, T.; Kanzaki, S. Synthesis of Porous Ceramics with Complex Pore Structure by Freeze-Dry Processing. *J. Am. Ceram. Soc.* **2001**, 84 (1), 230–232. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2001.tb00638.x>.
- (298) Dedovets, D.; Deville, S. Multiphase Imaging of Freezing Particle Suspensions by Confocal Microscopy. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2018**, 38 (7), 2687–2693. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.01.045>.
- (299) Dedovets, D.; Monteux, C.; Deville, S. Five-Dimensional Imaging of Freezing Emulsions with Solute Effects. *Science (80-. )*. **2018**, 360 (6386), 303–306. <https://doi.org/10.1126/science.aar4503>.
- (300) Mater, D. D. G.; Barbotin, J.-N.; Nava Saucedo, J. E.; Truffaut, N.; Thomas, D. Effect of Gelation Temperature and Gel Dissolving Solution on Cell Viability and Recovery of Two Pseudomonas Putida Strains Co Immobilized Withing Calcium Alginate or K-Carrageenan Gel Bead. *Biotechnol. Tech.* **1995**, 9 (10), 747–752.
- (301) Davies, D. G.; Chakrabarty, A. M.; Geesey, G. G. Substratum Activation of Alginate Gene Exopolysaccharide Production in Biofilms : Substratum Activation of Alginate Gene Expression by Pseudomonas Aeruginosa. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59 (4), 1181–1186. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(66\)80152-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(66)80152-X).
- (302) Nakamura, K.; Nishimura, Y.; Hatakeyama, T.; Hatakeyama, H. Thermal Properties of Water Insoluble Alginate Films Containing Di- and Trivalent Cations. *Thermochim. Acta* **1995**, 267 (C), 343–353. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(95\)02491-3](https://doi.org/10.1016/0040-6031(95)02491-3).
- (303) Martinsen, a; Skjåk-Braek, G.; Smidsrød, O. Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, 33 (1), 79–89. <https://doi.org/10.1002/bit.260330111>.
- (304) Smidsrod, O.; Skjak-Braek, G. Alginate as Immobilization Matrix for Cells. *Trends in Biotechnology* **1990**, 8, 71–78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O).
- (305) Fernandes, F. M. Development of Ice Templating Approaches for the Structuration of Biological Matter. In *Habilitation à Diriger des Recherches*; Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, UMR 7574, 2021.
- (306) Molin, G.; Nilsson, I. Degradation of Phenol by Pseudomonas Putida ATCC 11172 in Continuous Culture at Different Ratios of Biofilm Surface to Culture Volume. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, 50 (4), 946–950.
- (307) Dou, M.; Lu, C.; Rao, W. Bioinspired Materials and Technology for Advanced Cryopreservation. *Trends Biotechnol.* **2021**, No. July. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.06.004>.
- (308) Pal, P. *Industry-Specific Water Treatment*; 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810391-3.00006-0>.
- (309) István, P. *The European Environment-State and Outlook 2020. Knowledge for Transition to a Sustainable Europe*; 2020; Vol. 60. <https://doi.org/10.15196/TS600305>.
- (310) Sajn, N. Environmental Impact of the Textile and Clothing Industry. What Consumers Need to Know. *Eur. Parliam. Res. Serv.* **2019**, No. January.
- (311) Yaseen, D. A.; Scholz, M. *Textile Dye Wastewater Characteristics and Constituents of Synthetic Effluents: A Critical Review*; Springer Berlin Heidelberg, 2018; Vol. 16. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2130-z>.
- (312) He, F.; Hu, W.; Li, Y. Biodegradation Mechanisms and Kinetics of Azo Dye 4BS by a Microbial Consortium. *Chemosphere* **2004**, 57 (4), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.036>.

- (313) Surkatti, R.; El-Naas, M. H. Biological Treatment of Wastewater Contaminated with P-Cresol Using *Pseudomonas Putida* Immobilized in Polyvinyl Alcohol (PVA) Gel. *J. Water Process Eng.* **2014**, *1*, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.03.008>.
- (314) Æ, C. C. Æ. H. L.; Æ, C. C. Æ. C. Y.; Chung, Y.; Biodegradation, K.; Crystal, Á.; *Pseudomonas*, N. Á. Biodegradation of Crystal Violet by *Pseudomonas Putida*. **2007**, 391–396. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9265-6>.
- (315) Lee, K.; Park, J. W.; Ahn, I. S. Effect of Additional Carbon Source on Naphthalene Biodegradation by *Pseudomonas Putida* G7. *J. Hazard. Mater.* **2003**, *105* (1–3), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2003.08.005>.
- (316) Farrukh, J.; Peter, H. *Advances in Treating Textile Effluent*; BoD – Books on Demand, 2011, Ed.; 2011; pp 49–72.
- (317) Misal, S. A.; Gawai, K. R. Azoreductase: A Key Player of Xenobiotic Metabolism. *Bioresour. Bioprocess.* **2018**, *5* (1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0206-8>.
- (318) Tumer, M.; Tumer, F.; Kose, M.; Gungor, S. A.; Akar, S.; Demirtas, İ.; Ceyhan, G. Structural Characterizations, Photophysical and Biological Properties of Disperse Black 9 Dye and  $\pi$ -Extended Imine Derivatives. *Dye. Pigment.* **2018**, *154* (February), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.03.001>.
- (319) Cibinel, M.; Pugliese, G.; Porrelli, D.; Marsich, L.; Lughì, V. Recycling Alginate Composites for Thermal Insulation. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *251* (June 2020), 116995. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116995>.
- (320) Birnbaum, S.; Pendleton, R.; Larsson, P. O.; Mosbach, K. Covalent Stabilization of Alginate Gel for the Entrapment of Living Whole Cells. *Biotechnol. Lett.* **1981**, *3* (8), 393–400. <https://doi.org/10.1007/BF01134097>.
- (321) Tatiana Rocio, A.-C.; Danie, A.-C.; Perullini, M.; Santagapita, P. R. A Detailed Microstructural and Multiple Responses Analysis through Blocking Design to Produce Caalginate Beads Loaded with Bioactive Compounds Extracted from by Products. *Food Hydrocoll. Heal.* **2021**, *1*. <https://doi.org/0.1016/j.fhfh.2021.100030>.
- (322) Rokstad, A. M. A.; Laciík, I.; de Vos, P.; Strand, B. L. Advances in Biocompatibility and Physico-Chemical Characterization of Microspheres for Cell Encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 67–68, 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.010>.
- (323) Hillberg, A. L.; Kathirgamanathan, K.; Lam, J. B.; Law, L. Y.; Garkavenko, O.; Elliott, R. B. Improving Alginate-Poly-L-Ornithine-Alginate Capsule Biocompatibility through Genipin Crosslinking. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2013**, *101 B* (2), 258–268. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32835>.
- (324) Elnashar, M. M. M.; Danial, E. N.; Awad, G. E. A. Novel Carrier of Grafted Alginate for Covalent Immobilization of Inulinase. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48* (22), 9781–9785. <https://doi.org/10.1021/ie9011276>.
- (325) Gao, B.; Chen, L.; Zhao, Y.; Yan, X.; Wang, X.; Zhou, C.; Shi, Y.; Xue, W. Methods to Prepare Dopamine/Polydopamine Modified Alginate Hydrogels and Their Special Improved Properties for Drug Delivery. *Eur. Polym. J.* **2019**, *110* (November 2018), 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.11.025>.
- (326) Kim, B. J.; Park, T.; Moon, H. C.; Park, S. Y.; Hong, D.; Ko, E. H.; Kim, J. Y.; Hong, J. W.; Han, S. W.; Kim, Y. G.; Choi, I. S. Cytoprotective Alginate/Polydopamine Core/Shell Microcapsules in Microbial Encapsulation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (52), 14443–14446. <https://doi.org/10.1002/anie.201408454>.
- (327) Shen, F.; Li, A. A.; Cornelius, R. M.; Cirone, P.; Childs, R. F.; Brash, J. L.; Chang, P. L. Biological Properties of Photocrosslinked Alginate Microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2005**, *75* (2), 425–434. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30323>.

- (328) Thu, B.; Smidsrød, O.; Skjak-Brk, G. Alginate-Polycation Microcapsules for Cell Transplantation - Long Time Stability. *Prog. Biotechnol.* **1996**, *11* (C), 649–654. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80088-8](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80088-8).
- (329) Gåserød, O.; Sannes, A.; Skjåk-Bræk, G. Microcapsules of Alginate-Chitosan. II. A Study of Capsule Stability and Permeability. *Biomaterials* **1999**, *20* (8), 773–783. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00230-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00230-0).
- (330) Straccia, M. C.; D’Ayala, G. G.; Romano, I.; Oliva, A.; Laurienzo, P. Alginate Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (5), 2890–2908. <https://doi.org/10.3390/md13052890>.
- (331) Dhillon, G. S.; Kaur, S.; Brar, S. K.; Verma, M. Green Synthesis Approach: Extraction of Chitosan from Fungus Mycelia. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2013**, *33* (4), 379–403. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.717217>.
- (332) Kaur, S.; Dhillon, G. S. Recent Trends in Biological Extraction of Chitin from Marine Shell Wastes: A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2015**, *35* (1), 44–61. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798256>.
- (333) Nualkaekul, S.; Lenton, D.; Cook, M. T.; Khutoryanskiy, V. V.; Charalampopoulos, D. Chitosan Coated Alginate Beads for the Survival of Microencapsulated *Lactobacillus Plantarum* in Pomegranate Juice. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (3), 1281–1287. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.073>.
- (334) Liouni, M.; Drichoutis, P.; Nerantzis, E. T. Studies of the Mechanical Properties and the Fermentation Behavior of Double Layer Alginate-Chitosan Beads, Using *Saccharomyces Cerevisiae* Entrapped Cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24* (2), 281–288. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9467-7>.
- (335) Hajifathaliha, F.; Mahboubi, A.; Bolourchian, N.; Mohit, E.; Nematollahi, L. Multilayer Alginate Microcapsules for Live Cell Microencapsulation; Is There Any Preference for Selecting Cationic Polymers? *Iran. J. Pharm. Res.* **2021**, *20* (2), 173–182. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.114096.14660>.
- (336) Lei, H.; Xie, M.; Zhao, Y.; Zhang, F.; Xu, Y.; Xie, J. Chitosan/Sodium Alginate Modified Graphene Oxide-Based Nanocomposite as a Carrier for Drug Delivery. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (15), 17798–17805. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.08.108>.
- (337) Hannaford, A. M.; Kuek, C. Aerobic Batch Degradation of Phenol Using Immobilized *Pseudomonas Putida*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *22* (2), 121–126. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900617>.